



Andreia Filipa Batista de Almeida

Licenciada em Bioquímica

Alterações de pH após adição de pulsos de glucose a *Saccharomyces cerevisiae*: Estimativa de parâmetros a partir da modelação matemática do comportamento cinético-metabólico.

Dissertação para a obtenção do grau de mestre em Bioquímica Estrutural e Funcional

Orientação: Professora Doutora Teresa Maria Fonseca de Moura, Requite-CQFB, FCT-UNL
Professora Doutora Maria da Conceição Loureiro-Dias, CBAA, ISA-UTL
Co-Orientação: Professora Doutora Graça Soveral Rodrigues, Requite-CQFB, FCT-UNL

Júri:

Presidente: Professor Doutor José Ricardo Ramos Franco Tavares
Arguente: Doutora Catarina Paula Guerra Geoffroy Prista
Vogais: Professora Doutora Teresa Maria Fonseca de Moura
Professora Doutora Maria da Conceição Loureiro-Dias



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Outubro de 2011

2011

Alterações de pH após adição de pulsos de glucose a *Saccharomyces cerevisiae*: Estimativa de parâmetros a partir da modelação matemática do comportamento cinético-metabólico.
Andreia de Almeida





Andreia Filipa Batista de Almeida

Licenciada em Bioquímica

Alterações de pH após adição de pulsos de glucose a *Saccharomyces cerevisiae*: Estimativa de parâmetros a partir da modelação matemática do comportamento cinético-metabólico.

Dissertação para a obtenção do grau de mestre em Bioquímica Estrutural e Funcional

Orientação: Professora Doutora Teresa Maria Fonseca de Moura, Requimte-CQFB, FCT-UNL
Professora Doutora Maria da Conceição Loureiro-Dias, CBAA, ISA-UTL
Co-Orientação: Professora Doutora Graça Soveral Rodrigues, Requimte-CQFB, FCT-UNL

Alterações de pH após adição de pulsos de glucose a *Saccharomyces cerevisiae*:
Estimativa de parâmetros a partir da modelação matemática do comportamento cinético-
metabólico.

Copyright Andreia Filipa Batista de Almeida, FCT/UNL, UNL

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

AGRADECIMENTOS

Com o término de mais uma etapa académica quero deixar aqui expresso o meu agradecimento a várias pessoas e instituições que contribuíram muito para este trabalho.

Em primeiro lugar gostaria de expressar o meu agradecimento às minhas orientadoras, Professora Doutora Teresa Fonseca de Moura e Professora Doutora Maria da Conceição Loureiro-Dias, e co-orientadora, Professora Doutora Graça Soveral Rodrigues. À Professora Teresa por me ter acolhido de braços abertos desde a licenciatura e me ter criado o gosto pela modelação. A sua disponibilidade e dedicação foram fundamentais em muitos momentos cruciais ao longo de todo este percurso. À Professora Mané por me ter acolhido tão bem no seio do seu grupo, que foi muito importante no meu primeiro contacto com o mundo da microbiologia. Foi fundamental o seu contributo em muitas discussões e a sua paciência e sabedoria responder às muitas questões que fui tendo ao longo do trabalho e por alguns contratempos que fui tendo. À Professora Graça por ter sido uma peça-chave nas nossas discussões e por todo o seu apoio, moral e científico, desde o meu primeiro dia no laboratório. Todas foram muito importantes no meu desenvolvimento pessoal e científico ao longo dos últimos anos, sabendo transmitir-me confiança e mostrando-me o caminho certo a seguir. O meu muito obrigada!

Gostaria de expressar o meu agradecimento à Doutora Catarina Prista, por ter acompanhado a grande maioria do meu trabalho experimental de muito perto, ajudando-me sempre a resolver os problemas que surgiam e a esclarecer as dúvidas mais absurdas. Os conhecimentos que me transmitiu, quer práticos quer teóricos, foram fundamentais para o desenvolvimento e conclusão deste trabalho. O carinho e disponibilidade demonstrados foram sem dúvida excepcionais e fizeram com que conseguisse ultrapassar muitas das dificuldades.

À Doutora Joana Matos, que me ensinou o que sabia sobre microscopia de fluorescência. Batalhou e discutiu muitos dos problemas comigo, quer relativos a fluorescência, quer relativos a outras técnicas e resultados e com ela aprendi muito, não só de técnica, mas de método de trabalho.

A todos os meus colegas de laboratório no Instituto Superior de Agronomia, onde realizei a maior parte do trabalho experimental deste trabalho, Tiago, Maria José e Iliana, e elementos do Cooking Lab, em especial à Susana. Quero agradecer em especial ao Tiago que acompanhou de perto todo este trabalho desde o início, me esclareceu muitas dúvidas básicas e prescindiu de muito tempo seu para me ajudar. Obrigada pelo carinho, amizade e companheirismo!

Às minhas colegas de laboratório na Faculdade de Ciências e Tecnologia, Joana, Paula, Ana e Mariana e ao Pedro, por nos refrescar os dias. Todos me receberam de braços abertos no grupo, foram e são grandes amigas e sem eles os dias de trabalho no laboratório não teriam a mesma cor. Quero expressar um agradecimento especial a todo o grupo do Doutor Carlos Salgueiro, por terem sido tão disponíveis e terem cedido as suas instalações e aparelhos para eu poder realizar o meu trabalho na FCT.

À Faculdade de Ciências e Tecnologia quero agradecer as facilidades concedidas para a realização deste trabalho e o privilégio de ser formada por tão bons professores ao longo da minha

vida académica, tanto durante a licenciatura como no mestrado. Um agradecimento especial ao Instituto Superior de Agronomia por ter permitido que, sendo externa à faculdade, realizasse o meu trabalho experimental nas suas instalações.

Por fim, mas não menos importante, gostaria de agradecer à minha família e amigos que foram tão importantes para o meu desenvolvimento pessoal. À minha mãe e irmão que estiveram sempre lá e me apoiaram em todos os momentos da minha vida. À Guiguinha e toda a sua família, que me acolheram desde que nasci como se eu fosse um membro da família. Ao meu pai e ao Júlio, que já não estando cá, estarão sempre comigo e tiveram uma contribuição de relevo para me ter tornado a pessoa que sou hoje. À Márcia, por ter acompanhado o meu percurso académico nesta instituição desde o início, não só como colega, mas como uma grande amiga, apoiando-me sempre, mesmo nas decisões erradas. Ao Tiago, que esteve sempre ao meu lado desde o primeiro momento apoiando-me, sendo meu amigo e companheiro sempre. A ele devo muito do que sou.

Muito obrigada a todos, por terem feito parte do meu caminho e terem lançado sempre as pedras de base para eu o poder construir.

Andreia Filipa Batista de Almeida

RESUMO

As leveduras são microorganismos muito utilizados nas mais variadas indústrias e como modelos celulares em estudos biológicos e de genética molecular, razão pela qual é importante conhecer a fundo o seu comportamento e metabolismo. Assim, foi estudado o comportamento de uma estirpe de *S. cerevisiae* em condições anaeróbias, após adição de um pulso de glucose. O efeito resultante foi abordado experimentalmente e por modelação matemática e simulação numérica, de modo a caracterizar os sistemas de transporte envolvidos (glucose e protão), de metabolismo (constantes da glicólise) e das propriedades ácido base da membrana (pKs). A caracterização do sistema foi feita pelo assentamento das curvas teóricas (modelo matemático) aos dados experimentais obtidos, o que permitiu a estimativa de parâmetros.

A nível experimental, mediram-se variações de pH extra- e intracelular, variações da concentração extracelular de glucose e potássio, o potencial de membrana e as propriedades ácido-base da membrana. De forma complementar, a nível de modelação matemática e simulação numérica, considerou-se que os fluxos de entrada de glucose (por uniporte) e saída de protões (pela ATPase-H) seguiam uma cinética Michaeliana. O fluxo de entrada de protões movidos pela força protomotriz foi descrito pela equação de fluxo de Goldman. As variações de potencial de membrana tiveram em conta as variações dos potenciais de equilíbrio do protão, do potássio e a electrogeneidade dos restantes sistemas de transporte. Foram contabilizados no modelo as propriedades ácido base da membrana assim como as variações das concentrações intracelulares dos vários metabolitos, do ATP e do protão.

A abordagem escolhida na modelação matemática considerou diversas hipóteses restritivas. A abordagem quantitativa utilizada permitiu uma visão dinâmica geral dos processos de transporte e metabolismo envolvidos, revelando a complexidade dos fenómenos e sua inter-relação. Este tipo de modelos com carácter preditivo são ainda uma ferramenta essencial para a integração de informação dispersa na literatura e para o desenho de protocolos experimentais específicos pois permitem levantar questões só evidenciadas pela sua aplicação.

Palavras-chave: levedura, glucose, pH, potencial de membrana, K^+ , modelação matemática

ABSTRACT

Yeast is one of the most commonly used microorganisms both in industry and biological and molecular genetics studies. It is therefore important to increase knowledge on behaviour and metabolism. For this purpose, a cellular suspension of *S. cerevisiae* under anaerobic conditions was studied following a glucose pulse. The observed effect was investigated both under experimental conditions and also using a mathematical model and numerical simulation approach. Behaviour of transport systems (glucose and protons), metabolism (glycolysis constants) and membrane acid-base properties (pKs) were characterized by fitting theoretical curves to experimental data, thus allowing the estimation of parameters.

The experimental studies comprised variations of extra- and intracellular pH, extracellular concentration of glucose and potassium, membrane potential and a membrane titration curve. In addition, the modelling approach considered glucose uptake by uniport, proton efflux through an H⁺-ATPase (both following a Michaelis-Menten kinetics), proton influx due to a protonmotive force (described by a Goldman flux) and the membrane potential defined by the equilibrium potentials of both protons and potassium and the electrogeneicity of other transport processes in the membrane.

Despite several restrictive assumptions, this model allows a quantitative and dynamic approach to investigate transport and metabolism processes, unravelling their complexity and interplay. These predictive models are essential tools to integrate information disperse in literature, thus allowing the design of experimental protocols and raising questions that would not be evident otherwise.

Keywords: yeast, glucose, pH, membrane potential, K⁺, mathematical modelling

GLOSSÁRIO

Símbolos e Abreviaturas		Unidades
Abs	Absorvância	
A_{cel}	Área de cada célula	cm^2
ADP	Adenosina Difosfato	
A_{total}	Área total das células de um ensaio	cm^2
ATP	Adenosina Trifosfato	
Bomba H^+ -ATPase	Proteína transportadora de prótons para o meio extracelular, com gasto de ATP	
cF	Carboxifluoresceína	
cFDA	Carboxifluoresceína diacetato	
E_H	Potencial de equilíbrio do próton	V
E_K	Potencial de equilíbrio do íon K^+	V
Electrogene	Parâmetro de electrogeneidade dos sistemas de transporte da membrana	V
F	Constante de Faraday	$C.mol^{-1}$
fem	Força electromotriz	V
G6P	Glucose 6-fosfato	
g_K	Condutância do íon K	
g_H	Condutância do próton	
in	Meio intracelular	
$J_{in \rightarrow out}^{H^+Bomba}$	Fluxo de saída de prótons para o meio extracelular através da H^+ -ATPase	mol
$J_{out \rightarrow in}^{H^+Difusão}$	Fluxo de entrada de prótons no meio intracelular através da membrana	mol
$J^{Gluconsumo}$	Fluxo de consumo de glucose intracelular	mol
$J^{G6Pconsumo}$	Fluxo de consumo de G6P	
$J_{uniporte}^{Gluout}$	Fluxo de entrada de glucose nas células, por uniporte	mol
K_d	Coeficiente de partição	
k_{fosf}	Constante cinética de fosforilação de glucose a G6P	s^{-1}
k_{gli}	Constante cinética que corresponde aos passos de transformação de G6P em ATP	s^{-1}

Símbolos e Abreviaturas		Unidades
K_{memb}	Constante de protonação da membrana	
K_M^{ATP}	Constante de afinidade da H^+ -ATPase para o ATP	mol.cm^{-3}
K_M^{Glu}	Constante de afinidade do transportador de glucose para o substrato	mol.cm^{-3}
$K_M^{H^+}$	Constante de afinidade da H^+ -ATPase para o protão	mol.cm^{-3}
MH_0	Concentração de membrana protonada a pH 14	mol.cm^{-3}
M_t	Concentração total de membrana	mol.cm^{-3}
n	Número de gerações ocorridas após um tempo t	
$NADP^+$ $NADPH$	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato	
N_{cel}	Número de células num ensaio	
N_0	Número de células presente no início da fase exponencial	
N_t	Número de células observada ao tempo t	
out	Meio extracelular	
$Perm_H$	Permeabilidade da membrana ao protão	mol.cm^{-1}
PLL	Poli-L-lisina	
R	Constante dos gases perfeitos	$\text{J.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$
t	Tempo	min ou s
T	Temperatura	K
TPB^-	Tetrafenilborato	
TPP^+	Tetrafenilfosfónio	
$V_{\text{in,cel}}$	Volume interno de cada célula	cm^{-3}
V_{in}	Volume interno total num ensaio	cm^{-3}
V_m	Potencial de membrana	V
V_M^{Bomba}	Velocidade máxima da H^+ -ATPase	$\text{mol.cm}^{-3}.\text{s}^{-1}$
V_M^{Glu}	Velocidade máxima do transportador de glucose	$\text{mol.cm}^{-3}.\text{s}^{-1}$
V_{susp}	Volume de suspensão celular adicionada em casa ensaio	cm^{-3}
μ	Taxa específica de crescimento	h^{-1}

ÍNDICE

I. Introdução	1
1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3
1.1. Morfologia, estrutura celular e crescimento	3
1.2. Organização da membrana celular em <i>S. cerevisiae</i>	5
1.3. Sistemas de transporte em <i>S. cerevisiae</i>	6
1.4. Exportação de prótons pela H ⁺ -ATPase do tipo P	7
1.5. Transporte de Glucose	8
1.6. Metabolismo	9
2. Objectivo	10
II. Materiais e Métodos	13
1. Crescimento e caracterização de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	15
1.1. Manutenção da cultura	16
1.2. Inóculo e pré-inóculo	16
1.3. Monitorização do crescimento	17
1.4. Recolha de células	17
1.5. Determinação do peso seco	17
2. Doseamento da glucose extracelular	18
3. Medição da variação de concentrações extracelulares de H ⁺ , K ⁺ e TPP ⁺	19
3.1. Medição da variação de pH extracelular	20
3.2. Medição da variação da concentração extracelular de K ⁺	21
3.3. Medição da variação da concentração extracelular de TPP ⁺	23
4. Determinação do pH intracelular	24
4.1. Microscopia de Fluorescência	24
4.2. Marcação com isótopos radioactivos	28
5. Modelo matemático e de simulação numérica	29
5.1. Potencial de membrana e potenciais de equilíbrio	30
5.2. Cálculo de fluxos	30
5.3. Cálculo de Quantidades e Concentrações	31
5.4. Propriedades ácido-base da membrana	32
III. Resultados e Discussão	35
1. Parâmetros de crescimento de <i>S. cerevisiae</i>	37
2. Determinação do peso seco e volume interno	38
3. Determinação dos parâmetros cinéticos de entrada de glucose	39
4. Variação do pH extracelular após adição de um pulso de glucose	40
4.1. Propriedades ácido-base da membrana: determinação de pKs	41
4.2. Calibração dos dados de pH extracelular	42
5. Variação do pH intracelular após adição de um pulso de glucose	44

5.1. Microscopia de Fluorescência	44
5.2. Marcação com isótopos radioactivos	50
6. Variação da concentração de K^+ extracelular após adição de um pulso de glucose	51
7. Potencial de membrana (V_m), E_H e E_K	54
8. Permeabilidade da membrana ao protão, $Perm_H$	56
9. Modelo global	57
9.1. Modelo geral	57
9.2. Inibição da bomba por híper ou depolarização da membrana	59
9.3. ATP formado e quantidade total de protões exportados	61
IV. Conclusões	63
V. Bibliografia	69
VI. Anexos	74
1. Composição de soluções	75
2. Concentração de glucose extracelular	76
3. Variação de pH extracelular após adição de um pulso de glucose	77
4. Ensaio de pH intracelular após adição de um pulso de glucose	77
4.1. Microscopia de Fluorescência	77
4.2. Marcação com isótopos radioactivos	79
5. Variação da concentração de K^+ extracelular após adição de um pulso de glucose	80
6. Permeabilidade da membrana ao portão	81
7. Modelo global	81

ÍNDICE DE FIGURAS

Nº	Legenda	Página
1	A - Células de <i>S. cerevisiae</i> observadas ao microscópio óptico, com uma objectiva de 100x e uma ampliação extra de 1.6x. B – Secção da figura A em que é possível observar células em processo de divisão, com as gémulas indicadas pelas setas.	4
2	Representação hipotética de uma curva de crescimento em escala logarítmica (a) e linear (b).	4
3	A - Representação do modelo apresentado por Singer & Nicolson; B - Representação de um modelo mais recente e mais completo; 1 - Região hidrofóbica da membrana. (Engelman, 2005).	5
4	Representação dos diferentes sistemas de transporte em <i>S. cerevisiae</i> ; a letra S representa o substrato; a) Uniporte; b) Antiporte; c) Simporte; d) Sistema de Transporte mediado por ATP; e) Canal; f) Difusão Passiva; g) ATPase. Esquema baseado em (Rest et al., 1995).	6
5	A - Representação esquemática de uma P-type H^+ -ATPase, (a: domínio fosfatase; b: domínio de fosforilação e transdução de iões; c: domínio cinase e de ligação do ATP; d: Domínio regulatório), baseado em (Rest et al., 1995); b) Modelo topológico da P-type H^+ -ATPase de fungos; resíduos a escuro são resíduos conservados e estão presentes nas ATPases PMA1 e PMA2 de <i>S. cerevisiae</i> (Ambesi et al., 2000).	8
6	A - Via metabólica da glicólise, em que uma molécula de glucose dá origem a duas moléculas de piruvato. B - Esquema representativo das vias possíveis do piruvato. Esquemas baseados em (Berg et al., 2002).	9
7	A - Esquema global representativo de todo o metabolismo da célula. B- Esquema representativo dos intermediários e processos considerados na construção do modelo matemático e de simulação numérica.	10
8	A e B representam a molécula de NADPH em duas perspectivas diferentes. Ficheiro PDB 1us0, gerado através do <i>software</i> Chimera. C - Espectro de absorção do NADPH (a) e do $NADP^+$ (b) (Ziegenhorn et al., 1976).	18
9	Esquema representativo da montagem utilizada para medir o pH extracelular de <i>S. cerevisiae</i> IGC 3507. A: Suspensão celular; B: Eléctrodo combinado de pH; C: Vaso reaccional, com entrada e saída de água, permitindo manter a suspensão celular a 25°C; D: Placa de agitação; E: Potenciómetro; F: Amplificador de sinal; G: Registador.	20
10	Esquema representativo da montagem dos eléctrodos. A – Tubo exterior do eléctrodo. B – Solução a 10 mM. C – Membrana. D – Corpo do eléctrodo.	21
11	A – Estrutura da 5-(e -6)-carboxifluoresceína diacetato (5(6)-cFDA), onde 5 e 6 correspondem às posições do grupo carboxilo em cada um dos isómeros (products.invitrogen.com). B – Estrutura da carboxifluoresceína (cF) hidrolisada e na sua forma fluorescente (Massou et al., 2000). C – Espectro de absorção (1) e emissão (2) da cF (products.invitrogen.com).	24
12	Esquema de montagem do sistema de fluorescência. A: Aparelho DG-4 (<i>Lambda DG-4, Sutter Instrument</i>) que contém os filtros de excitação utilizados; B: Microscópio (<i>Zeiss Axiovert 200</i>); C: Computador; D: Câmara (<i>Photometrics CoolSnap EZ</i>); E: Entrada do sistema de perfusão; F: Saída do sistema de perfusão, ligado a uma bomba de perfusão (MARCA); G: câmara de perfusão (modelo RC-37FC, <i>Warner Instruments</i>); H: Placa de Petri (<i>P35G-1.5-14-C MatTek Corp</i>); I: Células fixas no fundo de vidro da placa de Petri; J: Objectiva 100 x.	26

Nº	Legenda	Página
13	A – Painel superior: Sistema de perfusão com câmara fechada, em que as setas indicam a direcção do fluxo. Painel inferior: Sistema de câmara aberta, com volume fixo. a – Placa de Petri (<i>P35G-1.5-14-C MatTek Corp</i>); b – câmara de perfusão (<i>Warner Instruments RC-37FC</i>); c - entrada de fluxo; d – lamela de vidro; e – fundo de vidro com <i>coating</i> ; f – células aderentes; g – soluções a perfundir a diferentes valores de pH; i – solução de glucose 11 mM. B – Imagem da câmara de perfusão utilizada (<i>Warner Instruments RC-37FC</i>).	27
14	Diagrama de fluxo que representa o método utilizado pelo modelo matemático e de simulação numérica para ajustar os parâmetros aos dados experimentais.	29
15	Curvas de crescimento de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> IGC 3507-III em meio K, com agitação orbital a 180 rpm e 28°C, com diferentes volumes de cultura. ■ 125 mL e ● 1 litro, CBAA-ISA, UTL, □ 125 mL e ○ 1 litro, REQUIMTE-FCT, UNL.	37
16	A - Dados experimentais de glucose extracelular (○) e o respectivo ajuste (—). B- Curva representativa da quantidade de glucose importada para o meio intracelular. Em ambas as figuras os dados encontram-se normalizados para o peso seco do ensaio, em mg.	39
17	Curva representativa da variação de pH extracelular, correspondente a dois ensaios, com respectivo desvio padrão (representado a cinza). A seta indica o momento em que foi adicionada a glucose.	40
18	A – Variação do pH extracelular com a adição de pulsos de HCl (as setas indicam o momento de adição dos pulsos de HCl; as setas a cheio representam a adição de 0.5 µmol enquanto que as setas a tracejado indicam a adição de 0.1 µmol de HCl). B - Variação da concentração extracelular de protões em função do pH extracelular. ■ $[H^+_{livres}]$, △ $[H^+_{totais}]$, e ○ $[H^+_{ligados}]$.	41
19	a) Simulação da curva de titulação da membrana com início a pH 14 (—). b) Curva de titulação ajustada (ajuste representado por —) aos dados experimentais(○) apresentados na Figura 18. c) Simulação (—) da curva de titulação com os dados experimentais (◇) tratados de forma a começar no pH de início dos ensaios de pH extracelular (pH 5.8).	42
20	a) Ajuste (△) aos dados experimentais de protões totais em solução (—), apresentados na Figura 18. b) Ajuste (.....) aos dados experimentais (◇) tratados de forma a começar no pH de início dos ensaios (pH 5.8).	43
21	a) Curva experimental de $[H^+_{totais}]$ (△) calibrada a partir da Equação 43 e dos dados de pH extracelular. b) Curva experimental de $[H^+_{ligados}]$ (○), determinados directamente pela diferença entre os protões totais e os protões livres. c) Curva experimental de $[H^+_{livres}]$ (■), determinados directamente do pH extracelular.	43
22	Aspecto das células com <i>coating</i> de gelatina a 1%, (A) com uma ampliação de 10x e (B) com uma ampliação de 100x. Nas placas em que foi utilizado <i>coating</i> de gelatina a 5% (C e D) foi possível observar aglomerados em dois campos de visão distintos. Nos painéis inferiores é possível observar o aspecto das células de <i>S. cerevisiae</i> utilizando placas com <i>coating</i> de PLL 0.01%, (E) com uma ampliação de 10x e (F) com uma ampliação de 100x.	44
23	A - Sinal correspondente ao rácio médio 440 nm/ 495 nm, observado após um pulso de glucose, para todas as células fluorescentes no campo de visão (B). A seta a tracejado indica a alteração no tempo de exposição e a seta a cheio indica a adição de glucose 11 mM. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> apresentando fluorescência (B), obtida com 100 ms de exposição, ganho 2x, e a mesma imagem obtida no visível (C), ambas obtidas com uma objectiva de 100x e uma ampliação extra de 1.6x.	45

Nº	Legenda	Página
24	A - Calibração <i>in vivo</i> com soluções tampão a diferentes valores de pH, sem ácido acético (preparadas de acordo com (Breeuwer and Abee, 2000)), observado para todas as células fluorescentes no campo de visão (B). <i>Saccharomyces cerevisiae</i> apresentando fluorescência (B), obtida com 100 ms de exposição, ganho 2x, e a mesma imagem obtida no visível (C), ambas obtidas com uma objectiva de 100x e uma ampliação extra de 1.6x. As setas indicam o momento de início da adição, por perfusão, das soluções aos valores de pH indicados.	47
25	A - Calibração <i>in vivo</i> com soluções tampão a diferentes valores de pH, sem ácido acético (preparadas de acordo com (Gomori, 1955)), observado para todas as células fluorescentes no campo de visão (B). <i>Saccharomyces cerevisiae</i> apresentando fluorescência (B), obtida com 100 ms de exposição, ganho 2x, e a mesma imagem obtida no visível (C), ambas obtidas com uma objectiva de 100x e uma ampliação extra de 1.6x. As setas indicam o momento de início da adição, por perfusão, das soluções aos valores de pH indicados.	48
26	C - Sinal correspondente ao rácio 440 nm/ 495 nm observado para a perfusão das soluções de cFDA hidrolisada a diferentes valores de pH, obtido com 100 ms exposição e ganho 1x. D – Dados experimentais médios de rácio 440 nm/495 nm, <i>in vivo</i> (□) e <i>in vitro</i> (○), obtidos a partir dos dados apresentados no panel C e na Figura 23-A, e respectivos ajustes (..... e —) utilizando a Equação 44. As setas indicam o momento de início da adição, por perfusão, das soluções aos valores de pH indicados.	49
27	A - Valores médios de pH intracelular em função do tempo (○). B- Valores médios de pH intracelular em função do pH extracelular (○) e desvio padrão, bem como o ajuste efectuado aos dados (—).	50
28	A - Variação do pH intracelular ao longo do ensaio (----), determinado a partir do pH extracelular (—) e da Equação 45. B- Diferença entre pH intra e extracelular. A seta indica o momento em que foi adicionada a glucose.	51
29	Calibração do sinal de potássio extracelular por adição de volumes de uma solução de KCl de concentração conhecida ao fim de 40 minutos (A) e no mínimo de concentração extracelular (C). As setas representam o momento da adição da solução e a quantidade de K ⁺ adicionada encontra-se indicada. B- Pontos experimentais relativos aos dados apresentados em C (○), com um ajuste polinomial (—). Estes dados foram obtidos para uma sensibilidade de 0.1 e uma velocidade de papel de 3 cm.min ⁻¹ .	52
30	Dados relativos ao valor médio dos dois ensaios obtidos para a concentração extracelular de K ⁺ (○) e ajuste aos dados (—). Estes dados foram obtidos para uma sensibilidade de 0.1 e uma velocidade de papel de 3 cm.min ⁻¹ .	53
31	A- Representação da quantidade de K ⁺ importado para o meio intracelular em número de moles por cada mg de peso seco. B- Variação da concentração intracelular de K ⁺ , tendo em conta uma concentração inicial de 200 mM.	54
32	Ensaio de variação de TPP ⁺ extracelular após adição de um pulso de glucose. As setas indicam o momento da adição das soluções indicadas.	54
33	Potencial de equilíbrio do protão (A) e do ião potássio (B), determinados a partir dos dados experimentais. Em B encontram-se representados os dados experimentais (○) e o respectivo ajuste (—).	55

Nº	Legenda	Página
34	<p>A - Variação do pH extracelular antes da adição de glucose (apenas é apresentada uma das curvas obtidas). B- Ajuste (—), através da equação de fluxo de Goldman, à Variação da concentração extracelular de prótons livres; estão representadas as três curvas experimentais obtidas. Estes dados foram obtidos com uma sensibilidade de 0.5 e uma velocidade de papel de 3 cm.min⁻¹.</p>	56
35	<p>Dados experimentais de concentração de prótons ($[H^+]_{\text{totais}}$ -Δ; $[H^+]_{\text{ligados}}$ -\circ; $[H^+]_{\text{livres}}$ -\square) e simulações destas concentrações (a - $[H^+]_{\text{totais}}$; b - $[H^+]_{\text{ligados}}$; c - $[H^+]_{\text{livres}}$; representadas por linhas) utilizando um grau de protonação (A), com um pK_{memb} de 6.38, e dois graus de protonação (B), com pK_{memb_1} e pK_{memb_2} de 6.5 e 5.945, respectivamente. C – Ajuste aos dados experimentais simulando um grau de protonação (curvas a cheio) e dois graus de protonação (curvas a tracejado). d) Simulação da curva de titulação da membrana com início a pH 14 (—). e) Curva de titulação ajustada (ajuste representado por —) aos dados experimentais(\circ) apresentados na Figura 19. f) Simulação (—) da curva de titulação com os dados experimentais (\diamond) tratados de forma a começar no pH de início dos ensaios de pH extracelular (pH 5.8).</p>	59
36	<p>Dados experimentais de concentração de prótons ($[H^+]_{\text{totais}}$ -Δ; $[H^+]_{\text{ligados}}$ -\circ; $[H^+]_{\text{livres}}$ -\square) e simulações destas concentrações (a - $[H^+]_{\text{totais}}$; b - $[H^+]_{\text{ligados}}$; c - $[H^+]_{\text{livres}}$; representadas por linhas), com um grau de inibição (A) e dois tipos de inibição da bomba (B). B - Potencial de equilíbrio do próton (E_H) calculado no modelo (—) e potencial de equilíbrio do potássio (---). D - Potenciais de membrana para a situação a) (—) e b) (—). Nos painéis E e F encontram-se representados, para as situações a) e b) respectivamente, o efluxo de prótons pela bomba (—) e o influxo de prótons por permeabilidade (—).</p>	60
37	Concentrações intracelulares de (A) glucose (—), G6P (—) e (B) ATP.	62

ÍNDICE DE TABELAS

Nº	Legenda	Página
1	Composição do Meio K, de acordo com (van Uden, 1967).	15
2	Composição do meio rico YPD.	16
3	Volumes das soluções utilizadas nos ensaios para o doseamento da glucose extracelular.	19
4	Volumes utilizados nos ensaios de medição do pH extracelular com adição de glucose, para um volume final de 5 mL.	20
5	Volumes utilizados nos ensaios de permeabilidade e determinação do poder tampão da membrana.	21
6	Proporções de valinomicina/solvente utilizadas para a preparação das membranas (Kamo et al., 1979).	22
7	Volumes utilizados nos ensaios de medição da concentração de K ⁺ extracelular após adição de um pulso de glucose, para um volume final de 15 mL.	22
8	Proporções de TPB-/solvente, utilizadas para a preparação das membranas (Kamo et al., 1979).	23
9	Volumes utilizados nos ensaios de medição da concentração de TPP ⁺ extracelular após adição de um pulso de glucose, para um volume final de 15 mL.	24
10	Volumes utilizados nos ensaios de medição do pH intracelular após adição de um pulso de glucose, através de radioactividade, para um volume final de 80 mL.	29
11	Taxa específica de crescimento e tempo de duplicação, para as diferentes culturas.	37
12	Pesos secos, volume interno, área e número de células nos diferentes ensaios.	39
13	Constantes cinéticas e concentração inicial obtidas através do ajuste aos dados experimentais de glucose extracelular.	40
14	Parâmetros determinados através dos ajustes à concentração de prótons ligados à membrana.	42
15	Parâmetros determinados através dos ajustes à concentração de prótons ligados à membrana, para dois graus de protonação.	59
16	Parâmetros estimados no modelo global para as situações a) e b).	61

I. INTRODUÇÃO

1. *Saccharomyces cerevisiae*

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é um dos microorganismos eucariontes mais estudados. O nome *Saccharomyces* deriva do latim: *saccharo*~ significa açúcar (*saccharum*) e *~myces* significa fungo. Já *cerevisiae* deriva do termo para cerveja em latim, uma vez que há muitos séculos que tem vindo a ser utilizada para fermentação de bebidas, nomeadamente cerveja, uísque e rum, e em panificação. Esta levedura continua ainda a ser muito utilizada neste tipo de indústria, sendo inclusive comum o seu uso caseiro, sob a forma de “fermento de padeiro”, não só para a confecção de bolos, massas e diversos tipos de pão mas também numa abordagem “caseira” de produzir dióxido de carbono em aquaculturas.

Mais recentemente, com uma emergente necessidade de produzir biocombustíveis, utiliza-se *S. cerevisiae* na produção de bioetanol (Bro et al., 2006), fermentando biomassa proveniente de plantas com elevado teor de açúcar, amido e/ou celulose. O álcool resultante pode ser utilizado por alguns tipos de motores, quando misturado com gasolina.

Para além de todas as suas aplicações na indústria e no dia a dia, esta levedura possui ainda um papel de destaque como modelo celular em estudos biológicos e de genética molecular. As razões são simples: (i) é um organismo eucarionte (o que o leva a ter algumas semelhanças com células animais); (ii) é unicelular (e, consequentemente, um organismo muito “simples”); (iii) é de fácil manipulação genética; (iv) fácil e económico de cultivar e manter; (v) é um organismo extensivamente estudado (o seu genoma foi o primeiro de eucariontes a ser totalmente sequenciado) (Williams, 1996). Assim, torna-se simples compreender a ampla utilização desta levedura em estudos de proteínas e biologia em geral, sendo que muitos avanços científicos em diversas áreas tiveram por base estudos realizados neste microorganismo.

A estirpe em estudo (*S. cerevisiae* IGC 3507-III) é um organismo deficiente respiratório, o que significa que, mesmo na presença de oxigénio, não existe respiração e apenas ocorre fermentação (van Uden, 1967). Assim, estas células adequam-se a estudos metabólicos realizados em ambiente aeróbio, o que seria impossível noutras estirpes.

1.1. *Morfologia, estrutura celular e crescimento*

Quando observadas ao microscópio óptico as células de *S. cerevisiae* apresentam uma forma ovalada (Figura 1) sendo por vezes possível observar uma gémula, dependendo da fase de divisão em que a célula se encontra.

Estas células possuem uma estrutura celular muito comum à dos restantes eucariontes, incluindo um núcleo revestido por membrana. Para além de membrana celular possuem, tal como as plantas, uma parede celular, que representa cerca de 30% do seu peso seco e que é constituída principalmente por proteínas e polissacáridos (cerca de 85%), dos quais 90% correspondem a moléculas de glucose (Lesage and Bussey, 2006). A parede tem uma função estrutural importante

pois, estando ligada a elementos do citoesqueleto, contribui para a manutenção da estrutura celular e impede a ruptura celular, mesmo em caso de pressões osmóticas muito elevadas no interior da célula. Devido às suas características de estrutura e elasticidade, ajuda à protecção da célula contra situações de *stress* do meio exterior e serve de suporte a uma camada externa de glicoproteínas (Klis et al., 2006).

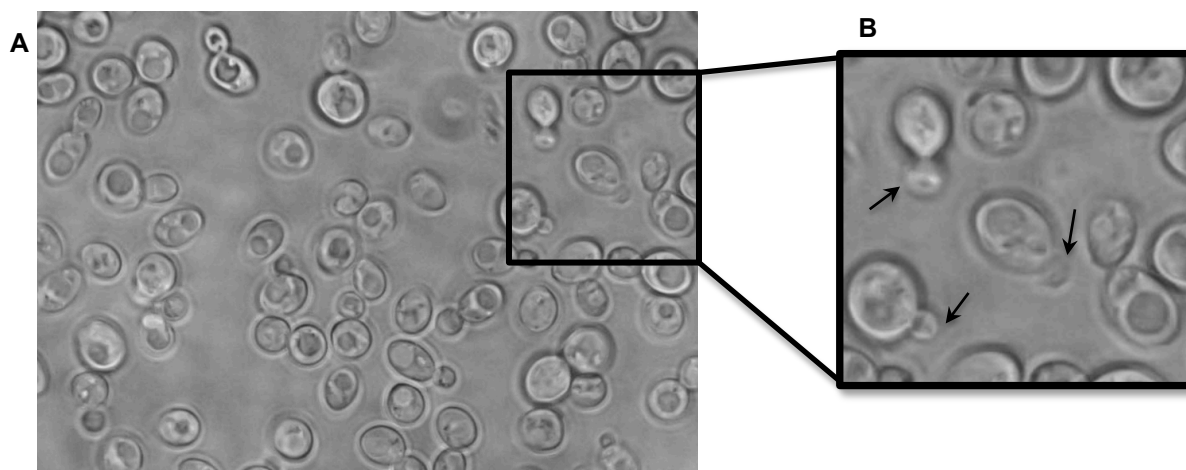


Figura 1: A - Células de *S. cerevisiae* observadas ao microscópio óptico, com uma objectiva de 100x e uma ampliação extra de 1.6x. B – Secção da figura A em que é possível observar células em processo de divisão, com as gémulas indicadas pelas setas. Imagem obtida com uma ampliação de 100x e uma ampliação extra de 1.6x.

As culturas de *S. cerevisiae*, como de outros microorganismos possuem um crescimento faseado: fase inicial (latência), em que as células se estão a adaptar ao meio e não se estão ainda a dividir, a fase exponencial, em que há maior crescimento celular, e a fase estacionária, em que já houve esgotamento de todos os nutrientes do meio e as células param o crescimento.

A fase exponencial de crescimento celular, corresponde à fase em que há uma duplicação do número de células e, por conseguinte, da biomassa. Nesta fase, a duplicação celular implica um

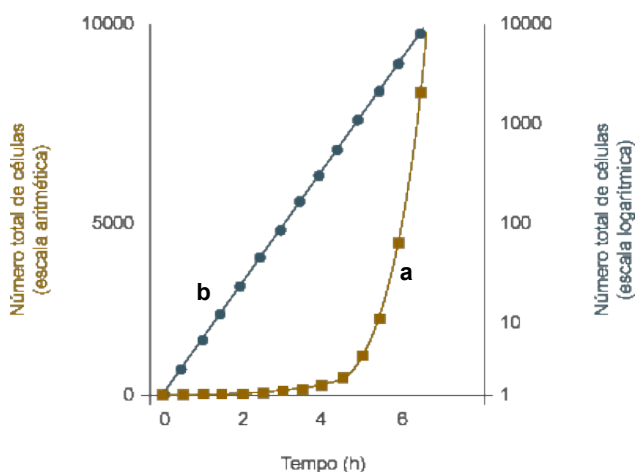


Figura 2: Representação hipotética de uma curva de crescimento em escala logarítmica (a) e linear (b).

aumento do número de células de acordo com uma função exponencial de base 2 (por exemplo, a duplicação de duas células em 4 pode ser expressa como $2^1 \rightarrow 2^2$), pelo que o número de células presente ao fim de um determinado tempo t (N_t) é dada pela Equação 1, em que N_0 corresponde ao número de células presente no início da fase exponencial e n o número de gerações ocorridas nesse tempo. É também possível determinar o número de gerações, rearranjando a Equação 1 em ordem a n (Equação 2).

Equação 1: $N_t = N_0 \times 2^n$

Equação 2: $n = \frac{\ln(N_t) - \ln(N_0)}{\ln(2)}$

Numa representação gráfica de dados experimentais da fase exponencial de crescimento é possível visualizar a forma exponencial da curva (Figura 2-a), que é dada por uma equação exponencial (Equação 3), em que μ representa a taxa específica de crescimento. No entanto, se for aplicada uma escala logarítmica os dados passam a ser representados sob a forma de uma recta (Figura 2-b), sendo possível estimar a μ a partir do declive da recta de ajuste.

Equação 3: $N_t = N_0 \times e^{\mu t}$

O tempo de duplicação corresponde ao tempo que leva a que a concentração celular duplique. Assim, quando $N_t = 2N_0$ na Equação 3, o tempo de duplicação é dado pela Equação 4.

Equação 4: $\text{tempo de duplicação} = \frac{\log(2)}{\mu}$

1.2. Organização da membrana celular em *S. Cerevisiae*

A membrana plasmática das leveduras é constituída por uma camada bilipídica de cerca de 7,5 nm (Rest et al., 1995). Esta camada contém lípidos polares e proteínas membranares que, ao interagirem, mantêm a estrutura da membrana, correspondendo ao modelo de mosaico fluido, apresentado por Singer & Nicolson (Singer and Nicolson, 1972). Neste modelo, as proteínas aparecem na membrana de forma pontual, rodeadas de lípidos, e podem mover-se sem restrições, pelo plano membranar.

O modelo apresentado por Singer & Nicolson representava, no entanto, um modelo muito básico, em que a quantidade e variedade de proteínas era reduzida e a membrana bastante fluida. Muito se evoluiu neste campo desde 1972: os modelos mais recentes apontam para um modelo mais “mosaico” e menos fluido, com uma grande variedade de proteínas membranares, entre elas, ATPases, transportadores e canais e uma menor mobilidade destas, uma vez que poderão estar associadas a outras proteínas, elementos do citoesqueleto ou matriz extracelular (Engelman, 2005).

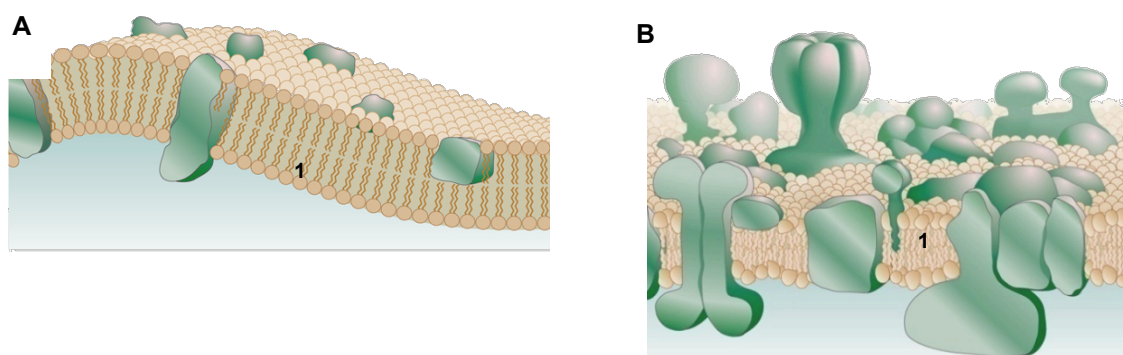


Figura 3: A - Representação do modelo apresentado por Singer & Nicolson; B - Representação de um modelo mais recente e mais completo; 1 - Região hidrofóbica da membrana. (Engelman, 2005)

A disposição dos lípidos de modo a formar a membrana leva à existência de uma região hidrofóbica, representada na Figura 3, para que as proteínas se possam integrar na membrana, é necessário que a região em contacto com a região hidrofóbica corresponda, na proteína, a uma região abundante em aminoácidos hidrofóbicos, usualmente em hélices- α (Rest et al., 1995).

Tanto proteínas como lípidos possuem uma distribuição assimétrica na membrana, com determinados tipos de proteínas e lípidos apenas num dos lados da membrana. As proteínas podem ainda ser de dois tipos: integrais de membrana, que atravessam a membrana e possuem domínios intra e extracelular, e proteínas periféricas, que se integram apenas em parte da membrana, possuindo apenas um dos domínios, intra ou extracelular.

1.3. Sistemas de transporte em *S. cerevisiae*

O transporte de um soluto, carregado ou não, através da membrana celular pode dar-se a favor ou contra o seu gradiente químico ou electroquímico. No primeiro caso, solutos lipossolúveis atravessam a membrana bilipídica por um mecanismo de partição/difusão (Figura 4-f). No caso de solutos polares e/ou carregados os solutos utilizam transportadores (proteínas). Neste caso, a classificação dos transportadores é feita tendo em conta as velocidades de transporte (até 10^3 s^{-1} para os *carriers*, Figura 4-a, e 10^7 - 10^8 s^{-1} para os canais, (Figura 4-e) (Moura, comunicação pessoal)).

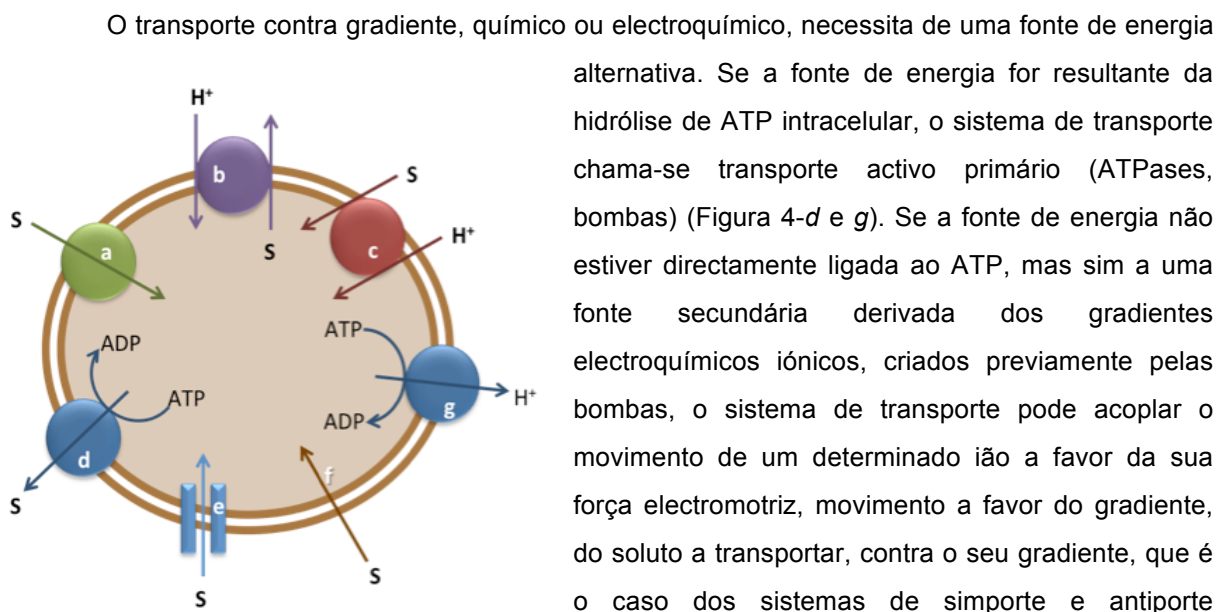


Figura 4: Representação dos diferentes sistemas de transporte em *S. cerevisiae*; a letra S representa o substrato; a) Uniporte; b) Antiporte; c) Simporte; d) Sistema de Transporte mediado por ATP; e) Canal; f) Difusão Passiva; g) ATPase. Esquema baseado em (Rest et al., 1995).

O transporte contra gradiente, químico ou electroquímico, necessita de uma fonte de energia alternativa. Se a fonte de energia for resultante da hidrólise de ATP intracelular, o sistema de transporte chama-se transporte activo primário (ATPases, bombas) (Figura 4-d e g). Se a fonte de energia não estiver directamente ligada ao ATP, mas sim a uma fonte secundária derivada dos gradientes electroquímicos iónicos, criados previamente pelas bombas, o sistema de transporte pode acoplar o movimento de um determinado ião a favor da sua força electromotriz, movimento a favor do gradiente, do soluto a transportar, contra o seu gradiente, que é o caso dos sistemas de simporte e antiporte (simporte quando o ião e o soluto se movem no mesmo sentido e antiporte quando o ião e o soluto se movem em sentidos contrários) (Figura 4-c e b, respectivamente).

As proteínas de transporte são, provavelmente, o principal constituinte proteico da membrana celular, pois existe uma quantidade enorme de transportadores para diferentes substratos. Por exemplo, cada aminoácido é transportado por, pelo menos uma proteína, enquanto que os açúcares são transportados por cerca de 15 proteínas diferentes (Grenson, 1992, Lagunas, 1993).

1.4. Exportação de protões pela H^+ -ATPase do tipo P

A principal proteína de membrana é a ATPase de protões, ou H^+ -ATPase, codificada pelo gene PMA1 (Ambesi et al., 2000). Em células na fase exponencial de crescimento pode corresponder a 50% de conteúdo proteico da membrana. Foi demonstrado que esta proteína não é apenas responsável pela extrusão de protões para manutenção do pH intracelular (Villalobo et al., 1981) e potencial de membrana (Carmelo et al., 1997), mas possui também um papel importante noutras funções relacionadas directamente com o papel da membrana plasmática: crescimento celular (Serrano, 1989), absorção de nutrientes (Kotyk, 1994) e osmoregulação (Marañón and Gervais, 2001).

A hidrólise de ATP pela H^+ -ATPase encontra-se acoplada à extrusão de protões, originando um gradiente de pH (ΔpH) que actua sobre os protões como uma força difusional (FD). Esta força, expressa em unidades de volt (V), é dada por $FD = -E_H$, em que E_H é o potencial de equilíbrio do protão, dado pela equação de Nernst (Equação 5). Assim, substituindo C_{in} e C_{out} pelas concentrações intra e extracelulares de protão e resolvendo a Equação 6, pode determinar-se que o potencial de equilíbrio do protão pode ser dado directamente pelo ΔpH ($\Delta pH = pH_{in} - pH_{out}$) (Equação 7).

Equação 5:
$$E_{i\grave{a}o} = -\frac{RT}{F} \ln \left(\frac{C_{in}}{C_{out}} \right)$$

Assim, para o caso do protão tem-se que,

Equação 6:
$$\begin{aligned} E_H &= -\frac{RT}{F} \ln \left(\frac{[H^+]_{in}}{[H^+]_{out}} \right) = -\frac{RT}{F} 2.3 \times \log \left(\frac{[H^+]_{in}}{[H^+]_{out}} \right) \\ &= -\frac{RT}{F} 2.3 \times (\log([H^+]_{in}) - \log([H^+]_{out})) = -\frac{RT}{F} 2.3 \times (-pH_{in} + pH_{out}) \\ &= \frac{RT}{F} 2.3 \times (pH_{in} - pH_{out}) \Leftrightarrow \end{aligned}$$

Equação 7:
$$\Leftrightarrow E_H = \frac{RT}{F} 2.3 \times \Delta pH$$

Por outro lado existe uma diferença de potencial entre o exterior e o interior da célula ($V_m = V_{in} - V_{out}$), que actua como uma força eléctrica nos protões. A soma destas duas forças corresponde à força electromotriz total que actua nos protões e é expressa por $fem_{H^+} = V_m - E_H$.

O potencial gerado neste processo é difícil de ser estimado, devido à falta de métodos que consigam medir com precisão o potencial membranar total. No entanto, existem algumas referências que indicam que este valor será aproximadamente de -200 mV (Ambesi et al., 2000, Serrano, 1991).

Foi demonstrado, através de estudos com ATP marcado com ^{32}P (Rest et al., 1995), que a H^+ -ATPase da membrana plasmática forma um intermediário acil-fosfato, que possui duas formas fosforiladas, denominadas E_1 e E_2 (Ambesi et al., 2000), que diferem em conformação. Desta forma, a H^+ -ATPase da membrana plasmática é denominada de tipo- E_1 - E_2 ou ATPase do tipo P e o seu mecanismo catalítico é diferente do das outras ATPases de *Saccharomyces*.

A ATPase é constituída por uma única cadeia polipeptídica, muito integrada na membrana, como se pode observar na Figura 5-B. Devido a ser necessário o uso de detergentes para a

solubilizar, o estudo desta ATPase é maioritariamente realizado recorrendo à reconstituição em lipossomas. Nestes estudos foi demonstrando que existe uma estequiometria de 1 próton expelido, por cada ATP hidrolisado (Ambesi et al., 2000).

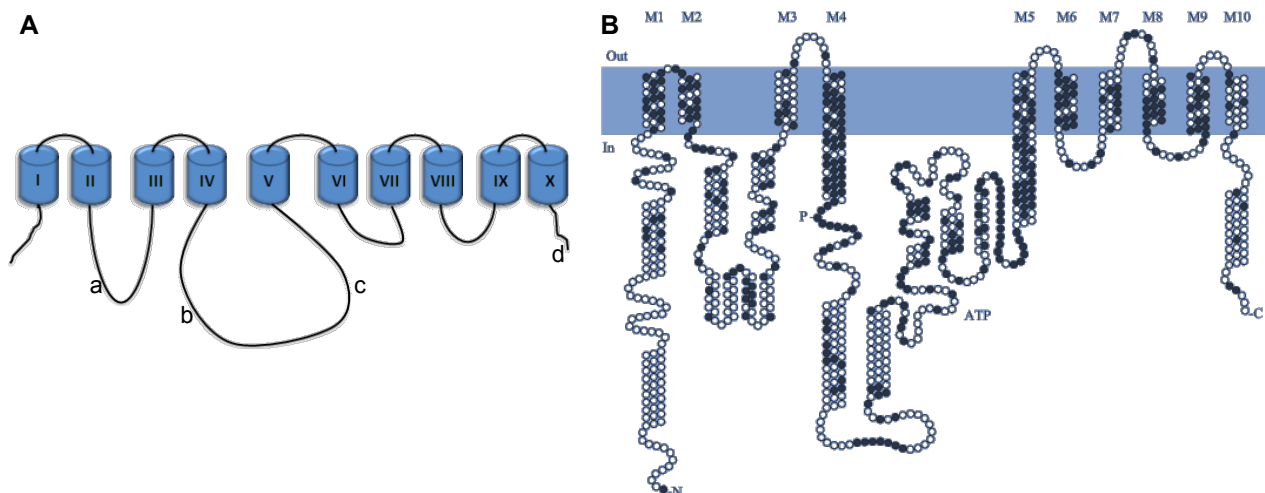


Figura 5: A - Representação esquemática de uma P-type H^+ -ATPase, (a: domínio fosfatase; b: domínio de fosforilação e transdução de iões; c: domínio cinase e de ligação do ATP; d: Domínio regulatório), baseado em (Rest et al., 1995); b) Modelo topológico da P-type H^+ -ATPase de fungos; resíduos a escuro são resíduos conservados e estão presentes nas ATPases PMA1 e PMA2 de *S. cerevisiae* (Ambesi et al., 2000).

Foram isolados genes que codificam para duas H^+ -ATPase do tipo P diferentes, ATPase PMA1 e ATPase PMA2. Embora sejam 90% idênticas a PMA2 tem a capacidade de complementar mutações no gene *PMA1*, quando sobre-expressa pelo promotor deste gene (Ambesi et al., 2000).

A constante de afinidade da H^+ -ATPase para o ATP, $K_M^{ATP-app}$, referenciada na literatura varia entre 0.8 e 1.2 mM e o seu pH óptimo é de 6.0 (Rest et al., 1995).

1.5. Transporte de Glucose

A glucose é uma das fontes de carbono preferenciais da levedura *S. cerevisiae* e o seu transporte para o meio intracelular é efectuado através de muitas proteínas transportadoras, com transporte por uniporte (Figura 4-a). A entrada de glucose para o meio intracelular é descrita normalmente por uma cinética hiperbólica simples de Michaelis-Menten, uma equação de velocidade inicial em função da concentração inicial de glucose extracelular com dois parâmetros concentrados: velocidade máxima de transporte (*uptake*) (V_M^{Glu}) e constante de afinidade para o substrato (K_M^{Glu}) (Gonçalves and Loureiro-Dias, 1994).

Equação 8:
$$v = \frac{V_M^{Glu}[glucose]_{out}}{K_M^{Glu} + [glucose]_{out}}$$

Este tipo de proteínas transportadoras é regulado por sensores de glucose. Existem dois tipos de sensores de glucose, o Snf3p e o Rgt2p. O primeiro é um sensor para baixas concentrações de glucose no meio extracelular e induz a transcrição de genes, *Hxt2* e *Hxt4*, que codificam transportadores de elevada afinidade ($K_M^{Glu} = 1\text{mM}$) para a glucose. O sensor Rgt2p, ao contrário do anterior, é um sensor para elevadas concentrações de glucose, induzindo a transcrição do gene

Hxt1, que codifica um transportador de glucose de baixa afinidade ($K_M = 20\text{mM}$) (Ozcan et al., 1996, Walsh et al., 1994).

1.6. Metabolismo

A estirpe utilizada possui duas vias metabólicas principais após adição de açúcar: glicólise e fermentação alcoólica (Figura 6).

Através da glicólise há a formação de 2 moléculas de piruvato, 2 moléculas de adenosina trifosfato (ATP) e 2 de nicotinamida adenina dinucleótido hidreto (NADH), por cada molécula de glucose.

Apesar de o piruvato poder seguir diferentes vias metabólicas, no caso da estirpe utilizada apenas pode seguir a via fermentativa, produzindo uma molécula CO_2 e outra de etanol por cada molécula de piruvato (resultando duas moléculas de piruvato por cada glucose).

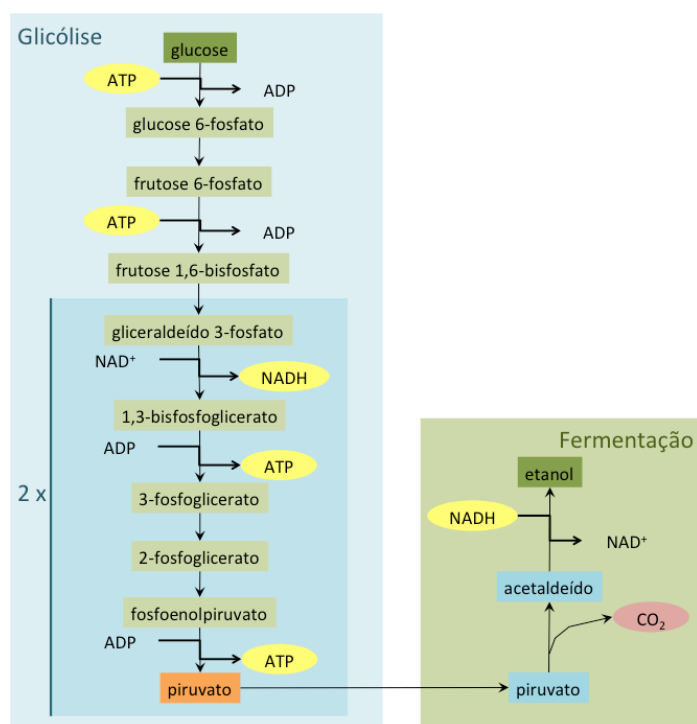
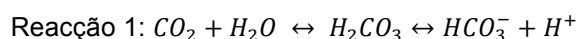


Figura 6: A - Via metabólica da glicólise, em que uma molécula de glucose dá origem a duas moléculas de piruvato. B - Esquema representativo das vias possíveis do piruvato. Esquemas baseados em (Berg et al., 2002).

Enquanto que o etanol é libertado para o meio extracelular, o ATP e NADH são utilizados em processos celulares. No caso deste trabalho, dado que as células utilizadas foram privadas de nutrientes durante algum tempo, partindo-se do princípio que estas esgotam todas as suas reservas de nutrientes, aminoácidos e açúcares em processos de manutenção celular enquanto se encontram em água (1 hora) e que a grande maioria do ATP produzido após a adição de glucose será utilizado pela H^+ -ATPase.

O CO_2 produzido equilibra, tanto no meio intra como no meio extracelular, com o ião bicarbonato (Reacção 1), utilizando os prótons disponíveis e podendo alterar o pH dos meios.



No modelo matemático considerou-se a variação do pH intracelular dada pelas medições experimentais realizadas. Deste modo, as variáveis pCO_2 (pressão parcial do CO_2) e concentração do ião bicarbonato (HCO_3^-) não são consideradas.

(viii) O potencial de membrana.

De forma a que o modelo reflita o mais fielmente possível o que se passa na célula, escolheu-se uma abordagem experimental que fornecesse medidas da variação temporal do maior número de variáveis após a aplicação de um pulso de glucose. Foi desenhado um protocolo experimental que considerasse os seguintes pontos:

(i) Variação da concentração extracelular de glucose, de forma a monitorizar a sua entrada na célula;

(ii) Variação do pH intracelular após adição de um pulso de glucose, permitindo perceber a influência do metabolismo;

(iii) Variação do pH extracelular, após adição de um pulso de glucose, resultante da exportação de prótons pela H^+ -ATPase, a sua importação devida à força protomotriz e a sua ligação/libertação da membrana devido às propriedades ácido base desta;

(iv) Medição, antes da aplicação de pulso de glucose, da variação de pH extracelular após aplicação de pulso de HCl permitindo avaliar a quantidade total de prótons exportados pela H^+ -ATPase e que permaneceram no meio externo (livres ou ligados à membrana);

(v) Variação do pH extracelular antes da adição do pulso de glucose, de forma a medir a entrada de prótons;

(vi) Variação da concentração extracelular de potássio, de forma a medir a entrada e saída deste ião por canais;

(vii) Medição da variação do potencial de membrana.

O procedimento escolhido para descrever o comportamento de leveduras em condições anaeróbicas, embora simplificado, é uma abordagem quantitativa que permite uma visão dinâmica geral dos processos de transporte e metabolismo envolvidos, revelando a complexidade dos fenómenos e sua inter-relação. Este tipo de modelos tem carácter preditivo sendo portanto uma ferramenta essencial que possibilita a integração de informação dispersa na literatura, o desenho de protocolos experimentais específicos e o levantar de questões só evidenciadas após os resultados das simulações deste tipo de modelos.

As leveduras em geral e *S. cerevisiae* em particular, como já foi referido, são muito utilizadas em indústrias e como modelos celulares em estudos de biologia e genética. Um conhecimento mais aprofundado do seu metabolismo e restantes processos celulares é importante para a optimização da sua utilização em qualquer uma das vertentes, tornando processos mais eficientes e dando mais informação para o desenho de procedimentos experimentais.

II. MATERIAIS E MÉTODOS

1. Crescimento e caracterização de *Saccharomyces cerevisiae*

Neste estudo foi utilizada a estirpe IGC 3507-III de *Saccharomyces cerevisiae*, mutante deficiente respiratória, realizando apenas fermentação e não respiração aeróbia, mesmo na presença de oxigénio (van Uden, 1967).

Tabela 1: Composição do Meio K, de acordo com (van Uden, 1967).

Composto	Fórmula Química	Concentração (g.L ⁻¹)
Monofosfato de Potássio	KH ₂ PO ₄	5
Sulfato de amónia	(NH ₄) ₂ SO ₄	5
Sulfato de Magnésio	MgSO ₄	0.5
Cloreto de Cálcio	CaCl ₂	0.15
Solução de glucose, com oligoelementos e vitaminas		
Composto	Concentração na solução	Concentração final no meio
Glucose	20% (p/v)	2% (p/v)
Oligoelementos A	0.5 mg.L ⁻¹	0.05 mg.L ⁻¹
Oligoelementos B	0.5 mg.L ⁻¹	0.05 mg.L ⁻¹
Vitaminas	0.5 mg.L ⁻¹	0.05 mg.L ⁻¹
Composição das soluções de oligoelementos		
Solução	Composto e Fórmula Química	
Oligoelementos A	Ácido Bórico (H ₃ BO ₃)	0.18% (p/v)
	Iodeto de Potássio (KI)	0.02% (p/v)
	Molibdato de Sódio (NaMoO ₄ .2H ₂ O)	0.04% (p/v)
Oligoelementos B (pH 3.5)	Sulfato de Cobre (CuSO ₄ .5H ₂ O)	0.08% (p/v)
	Cloreto de Ferro (FeCl ₃ .6H ₂ O)	0.04% (p/v)
	Sulfato de Manganês (MnSO ₄ .H ₂ O)	0.08% (p/v)
	Sulfato de Zinco (ZnSO ₄ .7H ₂ O)	0.08% (p/v)

Para a realização das experiências, o crescimento da cultura foi realizado em meio K (também denominado meio mínimo ou meio basal), realizado como descrito na literatura (van Uden, 1967). A sua composição encontra-se apresentada na Tabela 1. A solução de meio sem glucose foi autoclavada e armazenada, enquanto que a solução de glucose foi preparada separadamente e esterilizada por filtração em vácuo, com filtros de 0.22 µm de diâmetro, tendo sido adicionada ao meio apenas no momento do inóculo, de modo a evitar degradação e contaminação.

1.1. Manutenção da cultura

Para manutenção da cultura foi utilizado meio sólido YPD, um meio rico cuja composição se encontra descrita na Tabela 2. Tal como no caso do meio K, foi necessário preparar a solução de glucose a 20% separadamente e esterilizar por filtração em vácuo. No entanto, sendo este um meio sólido, adicionou-se a glucose antes de armazenar os tubos com o meio. A cultura foi inoculada e incubada durante a noite, a 28°C. Após o crescimento da cultura, esta foi mantida a 4°C. Sempre que necessário, inoculou-se a cultura em novos tubos com o mesmo meio, de forma a manter as culturas frescas.

Tabela 2: Composição do meio rico YPD.

Composto	Concentração
Extracto de levedura	10 g.L ⁻¹
Bacto-peptona	20 g.L ⁻¹
Glucose	2% (p/v)

1.2. Inóculo e pré-inóculo

O pré-inóculo foi preparado directamente a partir da cultura mantida em meio sólido YPD, como descrito no ponto II-1.1, transferindo a biomassa directamente para o meio K com 2% de glucose. Para os ensaios onde, após o pulso de glucose, se estuda a variação de (i) pH extracelular, (ii) pH intracelular por fluorescência, (iii) pH intracelular por radioactividade, (iv) concentração de potássio extracelular e (v) potencial de membrana, o crescimento do pré-inóculo foi realizado em 100 mL de meio K com 2% de glucose, num balão com um volume final de 200 mL (ou 250 mL no caso (ii)), durante a noite, a 28°C, com agitação orbital a 180 rpm numa incubadora *ShellLab SI Series*, *Sheldon Mfg. Inc* (ou incubadora *Thermo Scientific, MaxQ 4000*, para o caso (ii)).

O inóculo para o crescimento foi efectuado a partir de uma diluição do pré-inóculo, em 1 litro (125 mL para o caso (ii)) de meio K com 2% de glucose, num balão com um volume final de 2 litros (250 mL no caso (ii)). A incubação foi realizada a 28°C, durante a noite, com agitação orbital 180 rpm.

1.3. Monitorização do crescimento

Foram monitorizados dois conjuntos de curvas de crescimento da estirpe em estudo, um em cada local onde se realizaram os diferentes ensaios experimentais. O primeiro foi obtido nas instalações do laboratório do grupo de Bioenergética Microbiana (CBAA-ISA, UTL) e o segundo nas instalações do laboratório do grupo de Transporte Biológico (Requimte- FCT, UNL). Em cada conjunto foram realizadas duas culturas em dois volumes diferentes: (i) CBAA-ISA, UTL – uma em 1 litro de meio, com um volume final de 2 litros e outra em 250 mL de meio; (ii) Requimte- FCT, UNL – uma em 1 litro de meio, com um volume final de 2 litros e outra em 125 mL de meio. Os volumes utilizados foram determinados de forma a manter a proporção $\text{volume}_{\text{crescimento}}/\text{volume}_{\text{final}}$ e ambos os crescimentos foram realizados como descrito no ponto II-1.2.

Em ambas as curvas foi monitorizado um ponto a cada hora, com excepção do primeiro ponto, que foi obtido 2 horas após inóculo, durante um total de 19 horas. A monitorização do crescimento foi realizada através da medição da densidade óptica (DO) a 640 nm, num espectrofotómetro UV/Visível *Ultrospec 2100 Pro, Amersham Biosciences*, com água desionizada como referência.

1.4. Recolha de células

Para qualquer dos ensaios experimentais foi necessário obter células em fase exponencial de crescimento. Desta forma, optou-se por recolher as células a meio da fase exponencial, ou seja, com uma DO entre 0,8 e 1, correspondente a cerca de 1 mg (peso seco) /mL. A DO foi determinada como descrito no ponto II-1.3. A recolha de células foi realizada a 4°C, 12000 rpm, durante 3 minutos em uma centrífuga (*Eppendorf Centrifuge 5810 R*). As células foram lavadas duas vezes com água desionizada, de forma a retirar o meio de cultura restante. Após a centrifugação, o *pellet* celular foi ressuscitado em água desionizada, de forma a ser obtida a concentração final desejada para a execução do ensaio posterior.

1.5. Determinação do peso seco

Para a normalização dos dados experimentais foi necessária a determinação do peso seco de cada cultura celular utilizada. Assim, foram retiradas duas alíquotas de 200 µL de suspensão celular com DO 10 e depositadas em duas pequenas folhas de alumínio, com massa previamente determinada. Deixou-se secar numa estufa a 80°C durante pelo menos 16 horas. Mediram-se então as massas das alíquotas e o valor utilizado corresponde a uma média dos dois valores obtidos.

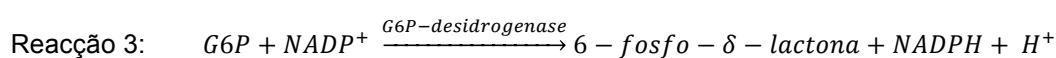
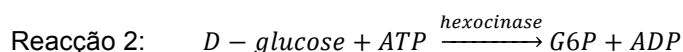
Outro método utilizado para a determinação de pesos secos foi a filtração da suspensão celular. Foram filtrados, por filtração em vácuo, 10 mL da suspensão celular de DO 1. Os filtros utilizados com massa previamente determinada, após filtração, foram colocados na estufa a 80°C

durante, pelo menos 16 horas. Tal como no procedimento anterior, após o tempo de secagem, foram medidas as massas e utilizado o valor médio dos valores obtidos.

2. Doseamento da glucose extracelular

Para dosear a glucose extracelular foi utilizado um kit de doseamento de D-glucose (*UV-Method R-Biopharm/ Boehringer Mannheim, Roche*, cat. 10.716.251.035), com base em métodos espectrofotométricos.

Este método de doseamento baseia-se em duas reacções enzimáticas:



A glucose presente na amostra é fosforilada pela hexocinase, com consumo de uma molécula de ATP, a Glucose 6- fosfato (G6P) que é convertida em 6-fosfo- δ -lactona com perda de dois prótons. Um desses prótons é utilizado para protonar a molécula de nicotamida adenina dinucleótido fosfato ($NADP^+$), que passa a NADPH. De acordo com as reacções descritas, a quantidade de NADPH formado é estequiometricamente equivalente à quantidade de D-glucose consumida. A quantidade de NADPH pode ser directamente determinada por espectrofotometria UV-Visível, uma vez que este composto possui o seu máximo de absorvância a 340 nm (Figura 8).

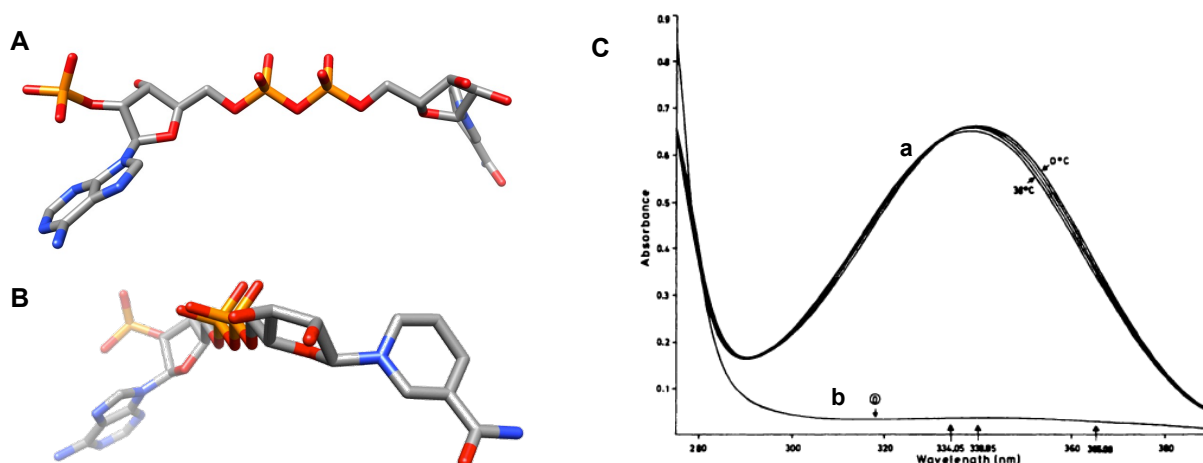


Figura 8: A e B representam a molécula de NADPH em duas perspectivas diferentes. Ficheiro PDB 1us0, gerado através do *software* Chimera. C - Espectro de absorção do NADPH (a) e do $NADP^+$ (b) (Ziegenhorn et al., 1976).

O kit de doseamento é composto por duas soluções diferentes: uma com uma solução tampão de pH 7.6, $NADP^+$ (Solução 1), ATP e sulfato de magnésio ($MgSO_4$) e outra composta por hexocinase e G6P (Solução 2).

Para o doseamento da glucose extracelular foi utilizada uma suspensão celular de 1 mg (peso seco)/mL, com agitação manual e com um volume final de 20 mL (volumes apresentados na Tabela 3).

Foram retiradas alíquotas de 1 mL em intervalos de 2 minutos, com auxílio de uma seringa (sem agulha). As amostras foram imediatamente filtradas, utilizando filtros de nitrocelulose (*Millipore*, CAS# 9004-70-0). A glucose presente no sobrenadante, correspondente ao meio extracelular, foi então doseada com recurso ao kit de doseamento. Para o doseamento foram realizadas diluições adequadas, em tubos *ependorf*, a cada uma das amostras, de forma a evitar manusear volumes muito pequenos e introduzir erros relevantes nas medições.

Tabela 3: Volumes das soluções utilizadas nos ensaios para o doseamento da glucose extracelular.

	Concentração inicial	Volume (mL)	Volume final (mL)	Concentração final
Água desionizada	---	16	20	---
Suspensão celular	10 mg (peso seco)/mL	2		1 mg (peso seco)/mL
Glucose	110 mM	2		11 mM

Para determinar a concentração de glucose foi necessário utilizar um branco, Solução 1 (com sol. Tampão, NADP⁺, ATP e MgSO₄) e medir a absorvância ((Abs₁)_{branco}) a 340 nm (passo realizado com recurso a um espectrofotómetro UV/Visível *Ultrospec 2100 Pro*, *Amersham Biosciences*). Foi também medida a absorvância das cuvetes ((Abs₁)_{amostra}) contendo apenas Solução 1 e amostra. Após esta leitura, foi adicionada a Solução 2, com a enzima hexocinase e G6P, de forma a dar início à Reacção 2 e Reacção 3. As amostras foram incubadas durante 15 minutos, tempo após o qual foram medidos novos valores de absorvância a 340 nm ((Abs₂)_{branco} e (Abs₂)_{amostra}). Todas as medições foram realizadas tendo água desionizada como referência.

Através das medidas de absorvância, quer das amostras quer do branco, foi determinada a concentração, directamente através da Equação 9 e 10, em g/L.

$$\text{Equação 9: } \Delta Abs = (Abs_2 - Abs_1)_{amostra} - (Abs_2 - Abs_1)_{branco}$$

$$\text{Equação 10: } [glucose] = \frac{V_{final} \cdot MM}{\epsilon_{340 \text{ nm}} \cdot V_{amostra} \cdot 1000}$$

Na Equação 10 o volume final é representado por V_{final}, enquanto que o V_{amostra} representa o volume de amostra. A massa molecular da glucose, em g/mol, é representada por MM e o coeficiente de extinção molar do NADPH a 340 nm por $\epsilon_{340 \text{ nm}}$.

3. Medição da variação de concentrações extracelulares: H⁺, K⁺ e TPP⁺

A medição da variação das concentrações extracelulares de H⁺ (pH), K⁺ e TPP⁺ foi realizada utilizando eléctrodos específicos para cada ião. Para cada ensaio, o eléctrodo específico encontrava-se acoplado a um potenciómetro (*Radiometer PHM82 standard*) e a um registador (*BBC Goerz*

Metrawatt SE 460), de acordo com o esquema da Figura 9. Para uma maior sensibilidade, foi ainda acoplado (entre o potenciômetro e o registrador) um amplificador de sinal (construído no Instituto Gulbenkian de Ciência).

Em todos os ensaios foi utilizada uma suspensão celular de partida, com DO 10, diluída com um factor 1:10, de acordo com o volume final de cada ensaio.

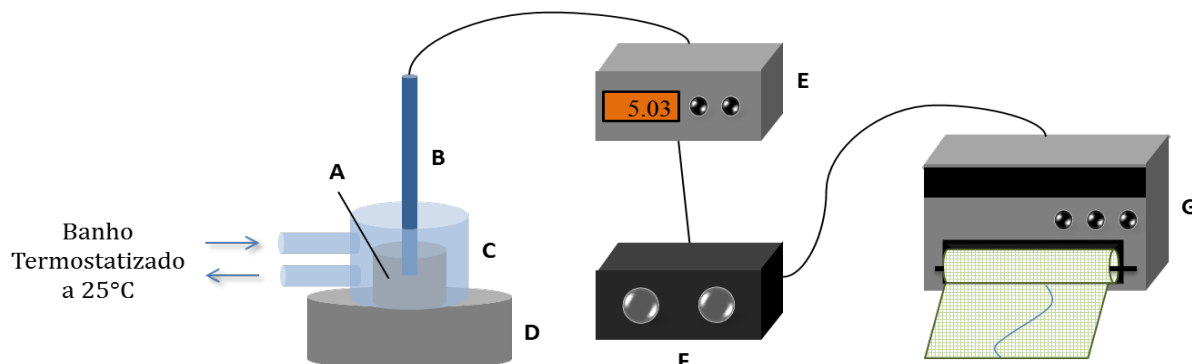


Figura 9: Esquema representativo da montagem utilizada para medir o pH extracelular de *S. cerevisiae* IGC 3507. A: Suspensão celular; B: Eléctrodo combinado de pH; C: Vaso reaccional, com entrada e saída de água, permitindo manter a suspensão celular a 25°C; D: Placa de agitação; E: Potenciômetro; F: Amplificador de sinal; G: Registrador.

3.1. Medição da variação de pH extracelular

Para a determinação da variação pH extracelular após um pulso de glucose foram utilizados os volumes de solução apresentados na Tabela 4 e foi adquirida uma linha de base durante cerca de 1 minuto, antes de adicionar a glucose, momento após o qual foi registado o sinal durante 40 minutos. Foi utilizado o esquema de montagem da Figura 9 com um eléctrodo combinado de pH (*Radiometer PHM 82*).

Nos ensaios para a determinação da permeabilidade difusional da membrana ao protão e determinação do poder tampão da membrana foram utilizados os volumes descritos na Tabela 5 e utilizado o mesmo esquema experimental utilizado para determinar o pH extracelular, com adição do pulso de glucose, excluindo o amplificador de sinal (F) e o registrador (G) (Figura 9). Nestas experiências foi registada a variação do pH extracelular durante cerca 10 minutos, para três curvas distintas, de forma a garantir reprodutibilidade dos dados experimentais.

Tabela 4: Volumes utilizados nos ensaios de medição do pH extracelular com adição de glucose, para um volume final de 5 mL.

	Concentração inicial	Volume (ml)	Volume final (ml)	Concentração final
Água desionizada	---	4	5	---
Suspensão celular	10 mg (peso seco)/ml	0.5		1 mg (peso seco)/ml
Glucose	110 mM	0.5		11 mM

Na determinação do poder tampão da membrana partiu-se de um pH de cerca de 7 (conseguido adicionando volumes determinados de NaOH 100 mM) e adicionaram-se volumes de HCl em pequenos passos, partindo de soluções de 1M, 100 e 10 mM.

Tabela 5: Volumes utilizados nos ensaios de permeabilidade e determinação do poder tampão da membrana.

	Concentração inicial	Volume (ml)	Volume final (ml)	Concentração final
Água desionizada	---	4.5	5	---
Suspensão celular	10 mg (peso seco)/ml	0.5		1 mg (peso seco)/ml

3.2. Medição da concentração extracelular de K^+

Para a preparação do eléctrodo de K^+ foi utilizada uma membrana com valinomicina, um antibiótico com uma elevada afinidade para o ião K^+ , sendo que a constante de estabilidade do complexo Valinomicina-Potássio é da ordem de 10^6 . Devido às suas propriedades físico-químicas e estruturais, possui uma afinidade 10000 mais elevada para o ião K^+ do que para o ião Sódio (Na^+), o que a torna um composto de extrema importância utilizado em sistemas biológicos (Forester et al., 1995, Rose and Henkens, 1974, Ogata and Rasmussen, 1966).

PREPARAÇÃO DAS MEMBRANAS

A preparação das membranas necessárias para a construção de eléctrodos sensíveis a K^+ foi realizada como descrito na literatura (Kamo et al., 1979), utilizando os volumes e quantidades apresentados na Tabela 6.

Após preparação das soluções estas foram rapidamente transferidas para placas de Petri com 2 cm de diâmetro, formando um filme, e aguardou-se secagem por cerca de 24 horas.

Os eléctrodos são constituídos pelo corpo do eléctrodo (que corresponde à parte eléctrica) e

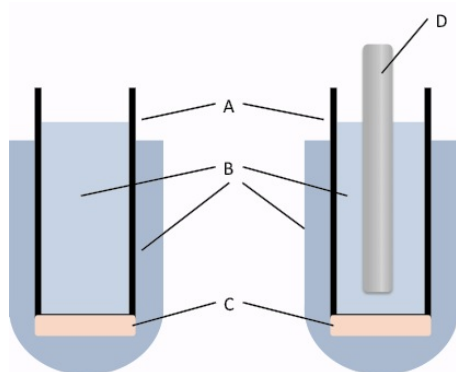


Figura 10: Esquema representativo da montagem dos eléctrodos. A – Tubo exterior do eléctrodo. B – Solução a 10 mM. C – Membrana. D – Corpo do eléctrodo.

pelo tubo exterior, com a membrana e a solução de KCl (Figura 10). Para a sua preparação utilizaram-se tubos exteriores de eléctrodos comerciais e colaram-se as membranas recorrendo a um solvente orgânico (tetracloreto de carbono), deixando-as a aderir durante 24 horas. Colocou-se 1 mL de solução KCL 10 mM no interior dos tubos exteriores dos eléctrodos, tendo o cuidado de não adicionar directamente na membrana, mas pela parede. Para equilibrar a membrana introduziram-se estes tubos exteriores em tubos de ensaio com 1 mL de solução de KCl 10 mM, pelo menos uma hora antes dos ensaios

experimentais (Figura 10). O corpo do eléctrodo foi então introduzido no tubo exterior com a membrana, com cuidado para não formar bolhas de ar na superfície (Figura 10).

Tabela 6: Proporções de valinomicina/solvente utilizadas para a preparação das membranas (Kamo et al., 1979).

Quantidade de valinomicina (mg)	Volume de solvente (μL)
2	100
4	100
2	200
4	200

TESTES DE SENSIBILIDADE

A utilização dos eléctrodos preparados só pôde ser determinada após a realização de testes de sensibilidade. Para tal, foram utilizados os eléctrodos preparados e previamente equilibrados, com um eléctrodo de referência (eléctrodo de ponte dupla, Ag/AgCl) e as soluções idênticas às utilizadas para os ensaios. Os testes foram realizados de duas formas: adicionando glucose à suspensão celular, ou seja, simulando os ensaios, e adicionando pulsos de KCl (10 mM).

Nenhum dos eléctrodos de K^+ mostrou possuir sensibilidade suficiente para a realização dos ensaios de determinação da concentração de K^+ extracelular, pelo que foi utilizado um eléctrodo de K^+ com membrana comercial (D821, 904-176, *Radiometer Copenhagen*).

MEDIÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE K^+ EXTRACELULAR

A determinação da variação da concentração de K^+ extracelular foi realizada como descrito no ponto II-3.1, utilizando o eléctrodo de membrana comercial e o mesmo eléctrodo de referência utilizado nos testes de sensibilidade. Os volumes utilizados nos ensaios encontram-se na Tabela 7. Tal como no ensaio de variação de pH após adição do pulso de glucose, também neste ensaio foi adquirida uma linha de base antes da adição da glucose, após o que foi adquirido sinal durante 40 minutos.

Tabela 7: Volumes utilizados nos ensaios de medição da concentração de K^+ extracelular após adição de um pulso de glucose, para um volume final de 15 mL.

	Concentração inicial	Volume (ml)	Volume final (ml)	Concentração final
Água desionizada	---	12	15	---
Suspensão celular	10 mg (peso seco)/ml	1.5		1 mg (peso seco)/ml
Glucose	110 mM	1.5		11 mM

3.3. Medição da concentração extracelular de TPP^+

Para a medição do potencial de membrana utilizou-se um eléctrodo preparado com uma membrana de Tetrafenilborato (TPB^-). Esta utilização baseia-se no facto de o ião TPB^- complexar iões Tetrafenilfosfónio (TPP^+) que se encontra em solução. Este último equilibra entre os compartimentos intra e extracelular das células, de acordo com o seu potencial de membrana (Renner-sattler et al., 2010, Kamo et al., 1979).

PREPARAÇÃO DAS MEMBRANAS E TESTES DE SENSIBILIDADE

A preparação das membranas de TPP^+ utilizadas foi realizado de acordo com o que se encontra descrito na literatura (Kamo et al., 1979) e no ponto II-3.2, utilizando as quantidades descritas na Tabela 8. Para equilibrar as membranas dos eléctrodos e realizar testes de sensibilidade foi também utilizado o método descrito no ponto II-3.2 utilizando uma solução de TPP^+Br^- a 10 mM.

Tabela 8: Proporções de TPB^- /solvente, utilizadas para a preparação das membranas (Kamo et al., 1979).

Quantidade de TPB^- (mg)	Volume de solvente (μ L)
2	100
1	100
2	200
1	200

MEDIÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE TPP^+ EXTRACELULAR

A determinação da concentração extracelular de TPP^+ foi realizada recorrendo a um eléctrodo com membrana de TPB^- (2 mg TPB^- + 100 μ L de solvente), equilibrado em 10 mM de TPP^+Br^- , como descrito no ponto II-3.2. Os volumes utilizados nesta experiência encontram-se na Tabela 9. Antes da adição de glucose foi adicionado TPP^+ , de forma a calibrar o sinal. A solução utilizada foi de 10 mM e foi adicionada em 3 passos até se atingir uma concentração final 27.7 μ M, antes de se adicionar glucose, sendo que corresponde a uma concentração final de 25 μ M. Após a adição de TPP^+ foi então adicionado o pulso de glucose e registado o sinal correspondente.

Tabela 9: Volumes utilizados nos ensaios de medição da concentração de TPP+ extracelular após adição de um pulso de glucose, para um volume final de 15 mL.

	Concentração inicial	Volume (mL)	Volume final (mL)	Concentração final
Água desionizada	---	11.96	15	---
Suspensão celular	10 mg (peso seco)/mL	1.5		1 mg (peso seco)/mL
Glucose	110 mM	1.5		11 mM
TPP ⁺	1 mM	0.0375		25 µM

4. Determinação do pH intracelular

4.1. Microscopia de Fluorescência

A espectroscopia de fluorescência é utilizada como meio de monitorizar alterações no ambiente físico-químico das sondas fluorescentes utilizadas, nomeadamente variações de pH e volume, no caso da carboxifluoresceína (cF), apresentada na Figura 11-B (Soveral et al., 2007). Assim, uma vez no meio intracelular, é possível utilizar esta sonda para determinar o pH intracelular das células em estudo, quer antes quer após o pulso de glucose extracelular.

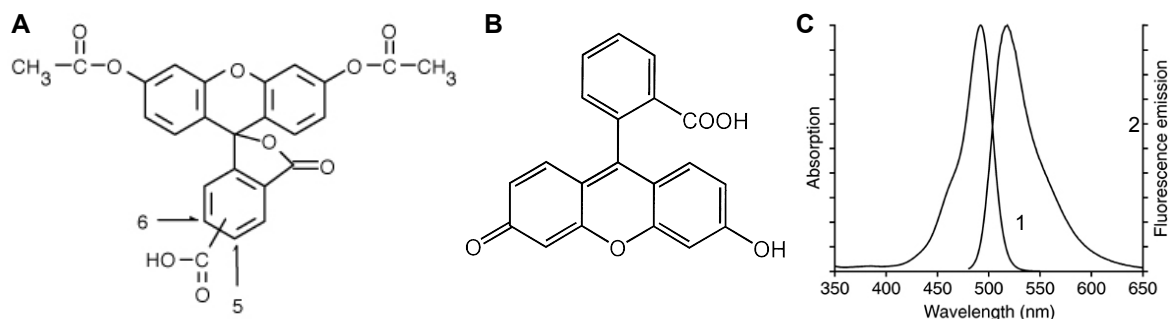


Figura 11: A – Estrutura da 5-(e -6)-carboxifluoresceína diacetato (5(6)-cFDA), onde 5 e 6 correspondem às posições do grupo carboxilo em cada um dos isómeros (products.invitrogen.com). B – Estrutura da carboxifluoresceína (cF) hidrolisada e na sua forma fluorescente (Massou et al., 2000). C – Espectro de absorção (1) e emissão (2) da cF (products.invitrogen.com).

O método baseia-se nas características da sonda que, ao entrar para o meio intracelular, é clivada por esterases intracelulares, passando de uma forma não fluorescente, carboxifluoresceína diacetato (cFDA) (Figura 11-A) para uma forma hidrolisada e fluorescente, denominada carboxifluoresceína (cF) (Breeuwer and Abee, 2000).

A técnica utilizada baseia-se na excitação da sonda ao seu comprimento de onda máximo de absorção ($\lambda_{exc_1} \approx 495$ nm), que reflecte variações de pH, e a um comprimento de onda em que apenas uma percentagem baixa da sonda absorva ($\lambda_{exc_2} \approx 440$ nm), que reflecte variações no volume celular. A intensidade de fluorescência é medida no comprimento de onda de máxima

emissão ($\lambda_{em} \approx 520$ nm) (os espectros de absorção e emissão da cF estão representados na Figura 11-C. É então calculado um rácio entre as intensidades de emissão após excitação aos dois comprimentos de onda, de modo a minimizar a possível interferência de variação de volume ao longo da experiência (Breeuwer and Abee, 2000).

COATING E ADESÃO CELULAR

Para a microscopia de fluorescência foram utilizadas placas de *Petri* de 35 mm com fundo em vidro (14 mm) (*P35G-1.5-14-C MatTek Corp*). Foram realizadas 3 lavagens a estas placas com uma solução composta por 20 g de NaOH, 120 mL de Etanol 95% e 80 mL de água desionizada. Após este tratamento, as placas foram lavadas 5 vezes com água desionizada, de forma a garantir a remoção de toda a solução anterior.

De forma a testar qual o *coating* com maior eficiência de adesão foi utilizada gelatina (*Merck*, Ref. 4078) a duas concentrações diferentes (1 e 5%) e poli-L-lisina (PLL, *FLUKA Biochemika*, Ref. 21879) a 0.01%. Após lavagem das placas, foram depositados 100 μ L de gelatina 1%, 5 % ou PLL 0.01% no centro da placas, sendo estas mantidas durante a noite no frio, de forma a que o composto aderisse à base da placa, utilizando o ambiente frio como forma de evitar possíveis contaminações. Lavaram-se por 3 vezes as placas com água desionizada.

Partiu-se de uma suspensão celular com uma concentração de 2 mg (peso seco)/mL e diluiu-se para uma concentração de 0,6 mg (peso seco)/mL. Foram depositados 100 μ L desta solução no centro das placas e mantiveram-se as placas no frio de forma a minimizar, não apenas contaminações, mas também o metabolismo celular. Ao final de uma hora, lavaram-se as placas com água desionizada por 3 vezes, para remover quaisquer células que não tenham aderido à PLL e resíduos contaminantes.

MARCAÇÃO COM CFDA

Para a marcação com o fluoróforo, as células, já aderidas às placas de *Petri*, foram incubadas com 100 μ L de solução de 5-(e -6)-carboxifluoresceína diacetato (5(6)-cFDA) 2 mM (*Sigma-Aldrich* CAS # 3348-03-6) em tampão citrato-fosfato, a pH 5 (Gomori, 1955). Esta incubação foi realizada durante 30 minutos a 30°C. Após incubação, as placas foram lavadas 5 vezes com água desionizada, de forma a retirar todo o fluoróforo que não tenha sido incorporado pelas células.

Na Figura 12 está representado o esquema de montagem geral. Foi utilizado um microscópio invertido (*Zeiss Axiovert 200*) ligado a uma câmara (*Photometrics CoolSnap EZ*), permitindo a transmissão de imagens do campo de visão para o computador. O sistema de iluminação utilizado, e acoplado ao microscópio, foi o *Lambda DG-4* (*Sutter Instrument*) contendo filtros de 440 e 495 nm para excitação da amostra. Todo este procedimento foi realizado ao resguardo da luz, de forma a minimizar uma possível degradação da cFDA.

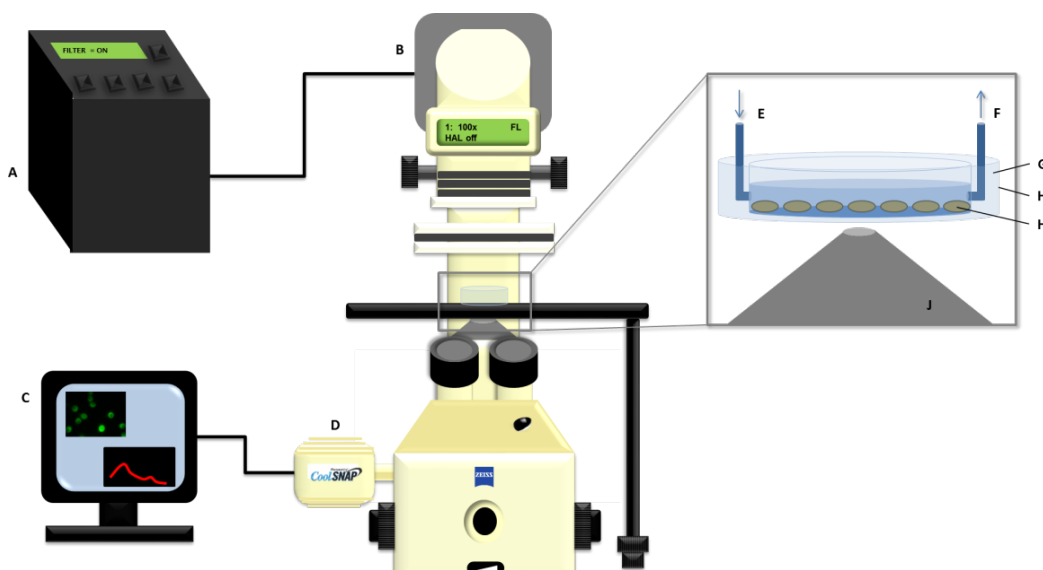


Figura 12: Esquema de montagem do sistema de fluorescência. A: Aparelho DG-4 (*Lambda DG-4, Sutter Instrument*) que contém os filtros de excitação utilizados; B: Microscópio (*Zeiss Axiovert 200*); C: Computador; D: Câmara (*Photometrics CoolSnap EZ*); E: Entrada do sistema de perfusão; F: Saída do sistema de perfusão, ligado a uma bomba de perfusão (MARCA); G: câmara de perfusão (modelo RC-37FC, *Warner Instruments*); H: Placa de Petri (*P35G-1.5-14-C MatTek Corp*); I: Células fixas no fundo de vidro da placa de Petri; J: Objectiva 100 x.

As placas de Petri contendo células marcadas com fluoróforo, foram montadas de duas formas diferentes: câmara fechada com sistema de perfusão, para calibração e câmara aberta sem sistema de perfusão, para ensaio com adição de glucose (Figura 13-A, painel inferior).

As imagens de fluorescência foram adquiridas através de um filtro de 535/25 nm incorporado no microscópio e pela câmara *CoolSnap*. Foi utilizado o *software* MetaFluor® Fluorescence Ratio Imaging (*Molecular Devices, LLC*) para processar e registar os dados obtidos pelo microscópio e pela câmara *CoolSnap*. Para cada experiência foram ajustados os dados de tempo de exposição e ganho e estes dados encontram-se apresentados na secção III-5.1, junto às figuras a que correspondem. Todas as imagens foram obtidas utilizando uma objectiva com ampliação 100x e uma lente intermédia denominada *optovar* com ampliação extra de 1.6x.

ENSAIOS COM ADIÇÃO DE GLUCOSE E CALIBRAÇÃO

Foram utilizadas placas de *Petri* com células aderentes, preparadas de acordo com o descrito anteriormente, e montadas de acordo com a Figura 12. Neste ensaio escolheu-se utilizar a câmara aberta e sem perfusão (Figura 13-A, painel inferior). Com o sistema de perfusão representado na Figura 13-A (Painel superior) não seria possível controlar o volume exacto de glucose que chegaria às células, uma vez que alguma da solução de saída poderia conter glucose não consumida e porque não é possível simular as condições dos outros ensaios, com o pH extracelular a variar, devido à acção da ATPase.

De modo a quantificar o efeito da adição de glucose, as células foram primeiramente incubadas num volume de 1.5 mL de solução tampão citrato-fosfato a pH 5 (Gomori, 1955) e adquirida a linha de base. De seguida, a solução tampão citrato-fosfato foi substituída por 1.5 mL de solução de glucose 11 mM, continuando a aquisição durante cerca de 15 minutos.

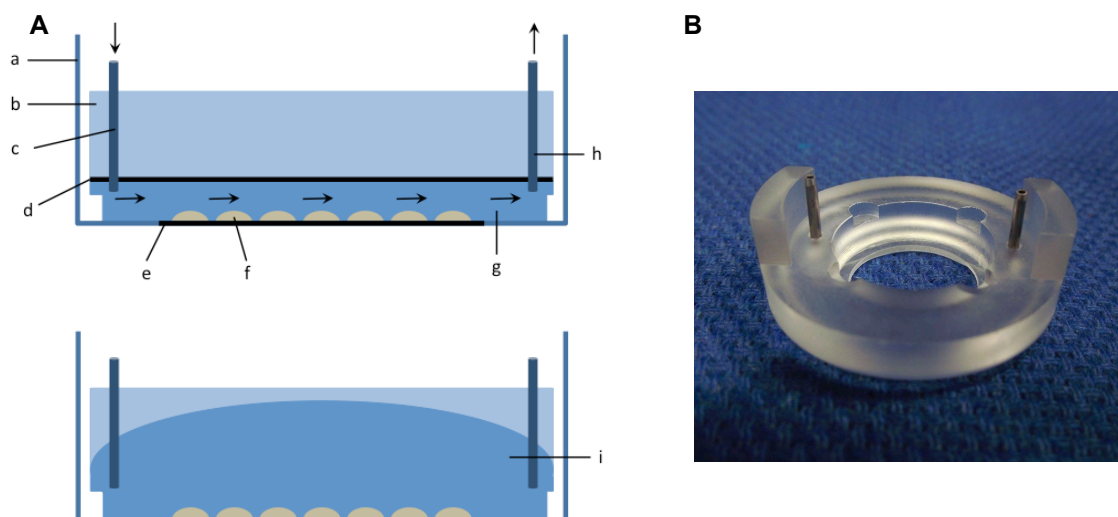


Figura 13: A – Paineis superior: Sistema de perfusão com câmara fechada, em que as setas indicam a direcção do fluxo. Paineis inferior: Sistema de câmara aberta, com volume fixo. a – Placa de Petri (*P35G-1.5-14-C MatTek Corp*); b – câmara de perfusão (*Warner Instruments RC-37FC*); c - entrada de fluxo; d – lamela de vidro; e – fundo de vidro com *coating*; f – células aderentes; g – soluções a perfundir a diferentes valores de pH; i – solução de glucose 11 mM. B – Imagem da câmara de perfusão utilizada (*Warner Instruments RC-37FC*).

A calibração do sinal obtido para o ensaio descrito no ponto anterior foi realizada de duas formas: *in vivo* e *in vitro*.

A calibração *in vivo* foi realizada de acordo com o que se encontra descrito na literatura (Breeuwer and Abee, 2000), em placas de Petri com células aderentes. Foram perfundidas soluções a diferentes valores de pH (4, 5, 6, 7, 8 e 9) compostas por glicina (50 mM), ácido cítrico (50 mM), Hidrato de Sódio Hidrofosfite (NaHPO₃, 50 mM), KCl (50 mM), com e sem 2% de ácido acético. Foi também realizada uma calibração *in vivo* através do mesmo método, mas utilizando soluções tampão preparadas de acordo com (Gomori, 1955): tampão citrato-fosfato a pH 4, 5, 6 e 7, tampão fosfato a pH 9 e tampão carbonato-bicarbonato a pH 9.2. A composição de todas estas soluções encontra-se descrita no Anexo.

A calibração *in vitro*, foi também realizada de acordo com o que se encontra descrito por (Breeuwer and Abee, 2000), através da perfusão de soluções a diferentes valores de pH (4 a 9) com cFDA previamente hidrolisada e na sua forma fluorescente, por placas lavadas, sem células nem PLL.

As imagens obtidas através do *software* MetaFluor® Fluorescence Ratio Imaging encontram-se numa escala de cinzentos. As imagens apresentadas neste trabalho foram submetidas a um tratamento de imagem, nomeadamente a aplicação de um filtro verde, utilizando o *software* de distribuição gratuita *Image J*.

As osmolaridades de todas as soluções utilizadas nesta parte experimental foram conferidas com um semi-micro osmómetro (*Knauer*), calibrado com água desionizada (correspondente ao zero) e com uma solução de NaCl 400 mosm/kg (12.687g NaCl/kg H₂O). Foram realizadas três medições para cada amostra.

4.2. Marcação com isótopos radioactivos

O método de medição do pH intracelular, antes e após a adição de um pulso de glucose, utilizada neste trabalho foi descrita por Rottenberg (Rottenberg, 1979) e baseia-se na utilização de ácidos ou bases fracos, dependendo da diferença entre o pH intra e extracelular, cujas espécies neutras possuam a capacidade de se difundir através da membrana celular e a membrana seja impermeável às suas formas carregadas. Desta forma, pode medir-se a distribuição relativa do composto marcado entre os meios intra e extracelular das células. No caso desta experiência foi utilizado ácido benzoico (HBz), marcado radioactivamente com ^{14}C .

Tendo em conta que a espécie neutra do ácido (HBz) se vai equilibrar entre os compartimentos intra e extracelular e que em cada um se vai dissociar de acordo com o pH do meio (pK_{HBz} é 4.21), tem-se que:

$$\text{Equação 11: } K_d = \frac{[\text{H}^+]_{\text{in}}[\text{A}^-]_{\text{in}}}{[\text{HA}]_{\text{in}}} = \frac{[\text{H}^+]_{\text{out}}[\text{A}^-]_{\text{out}}}{[\text{HA}]_{\text{out}}}$$

$$\text{Equação 12: } \text{pH}_{\text{in}} - \text{pH}_{\text{out}} = \Delta\text{pH} = \log \frac{[\text{A}^-]_{\text{in}}}{[\text{A}^-]_{\text{out}}}$$

O pH_{in} das leveduras é sempre superior a 5, logo sempre superior ao pK_{HBz} , sendo que o ácido benzoico estará fundamentalmente na sua forma ionizada (A^-) no meio intracelular. Se o pH_{out} for maior que o pK_{HBz} , o ácido vai também estar na sua forma ionizada no meio exterior sendo possível determinar a razão da distribuição pelos dois lados da membrana utilizando a Equação 12. Se pH_{out} ser inferior ao pK_{HBz} , a maior parte do ácido estará na forma não ionizada (HA), no exterior e, tendo em conta a Equação 13, no equilíbrio temos a razão que é dada pela Equação 14. Resolvendo este sistema de equações em função do pH_{in} obtém-se uma relação directa, em que o pH_{in} é determinado através da distribuição do ácido nos dois lados da membrana, Equação 15.

$$\text{Equação 13: } \text{A}_T = \text{A}^- + \text{AH}$$

$$\text{Equação 14: } \frac{\text{A}_{\text{in}}^T}{\text{A}_{\text{out}}^T} = \frac{\frac{1}{K_D} + \frac{1}{[\text{H}^+]_{\text{in}}}}{\frac{1}{K_D} + \frac{1}{[\text{H}^+]_{\text{out}}}}$$

$$\text{Equação 15: } \text{pH}_{\text{in}} = \log \left(\frac{\text{A}_{\text{in}}^T}{\text{A}_{\text{out}}^T} \left(\frac{1}{[\text{H}^+]_{\text{out}}} + \frac{1}{K_D} \right) - \frac{1}{K_D} \right)$$

Para marcar radioactivamente as células foi necessário adicionar 10 μL de uma solução de [7- ^{14}C] ácido benzoico (NENTM) a 25 mL de uma suspensão celular de DO 10. Incubou-se em gelo durante 90 minutos. Paralelamente, de forma a medir o pH extracelular, foi mantida em gelo e durante o mesmo tempo, 25 mL da mesma suspensão celular sem composto radioactivo.

Para a determinação do pH intracelular foram colocados dois copos de precipitação contendo a suspensão celular com e sem HBz (^{14}C) num banho a 25°C, com agitação manual. Foram retiradas amostras da suspensão marcada a cada 10 minutos, sendo que o ponto inicial corresponde ao momento de adição de glucose e o ponto final ao fim de 40 minutos. Cada amostra de 5 mL (em duplicado, para determinação da quantidade de ^{14}C radioactivo no meio intracelular) foi filtrada em vácuo, utilizando filtros circulares de 25 mm de diâmetro (*Whatman*, glass microfiber,

CAT#1822-025) e lavando-os duas vezes com água gelada. Os filtros foram então colocados em 5 mL de líquido de cintilação Optiphase "HiSafe" 2 (*Perkin Elmer*). Foram também centrifugadas amostras de 1 mL (em duplicado, para determinação da quantidade de ^{14}C radioactivo no meio extracelular), das quais foram retirados 100 μL do sobrenadante e depositados em 5 mL de líquido de cintilação. Paralelamente, foi utilizada a suspensão não marcada radioactivamente para determinar o pH extracelular. Foram realizados quatro ensaios idênticos e um quinto ensaio em que as amostras foram retiradas aos 0, 20 e 40 minutos.

A determinação da radioactividade das amostras foi realizada num contador de cintilações *Beckman LS 6000 LL*, programável para leituras de ^{14}C , com erro inferior a 1%.

Características do ácido radioactivo utilizado: $[7-^{14}\text{C}]$ ácido benzóico: quantidade de radioactivo presente no composto sólido - 18,5 MBq = 0,5 mCi ; actividade específica - 588,3 MBq / mmol = 15,90 mCi / mmol.

Tabela 10: Volumes utilizados nos ensaios de medição do pH intracelular após adição de um pulso de glucose, através de radioactividade, para um volume final de 80 mL.

	Concentração inicial	Volume (mL)	Volume final (mL)	Concentração final
Água desionizada	---	64	80	---
Suspensão celular	10 mg (peso seco)/mL	8		1 mg (peso seco)/mL
Glucose	110 mM	8		11 mM

5. Modelo matemático e de simulação numérica

O modelo matemático desenvolvido considerou o esquema da Figura 7 e seguiu uma estratégia de cálculo apresentada no diagrama de fluxo da Figura 14.

Os dados experimentais utilizados para assentamento das curvas teóricas simuladas pelo modelo geral foram os da variação do pH extracelular e os resultantes das propriedades ácido base da membrana. Para fornecer estimativas iniciais dos parâmetros e das condições iniciais, utilizaram-se os vários conjuntos de dados experimentais (pH_{in}, pH_{out}, concentração externa de glucose e K^+) que foram analisados de forma independente. No

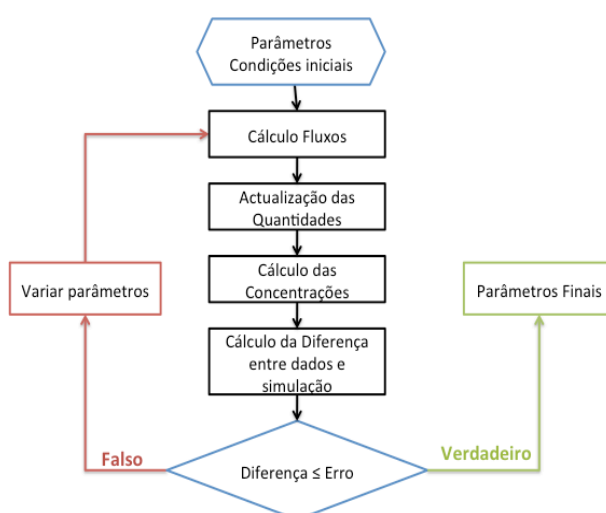


Figura 14: Diagrama de fluxo que representa o método utilizado pelo modelo matemático e de simulação numérica para ajustar os parâmetros aos dados experimentais.

modelo geral, os fluxos de entrada de glucose e saída de prótons pela H^+ -ATPase foram descritos com cinéticas michaelianas simples, o fluxo de prótons movidos pela força protomotriz pela equação de fluxo de Goldman, o potencial de membrana calculado tendo em conta a distribuição intra e extracelular dos iões K^+ e H^+ . A variação de pH intracelular foi calculada a partir de um ajuste obtido a partir de dados experimentais de pH_{in} em função do respectivo pH_{out} . A variação das quantidades foi calculada pela diferença entre as entradas e saídas de cada compartimento e as concentrações determinadas a partir das respectivas quantidades e volumes dos compartimentos.

A nomenclatura utilizada para as variáveis e parâmetros das equações assim como as respectivas unidades encontram-se sistematizadas no Glossário.

5.1. Potencial de membrana e potenciais de equilíbrio

Considera-se que o potencial de membrana é fundamentalmente determinado pela distribuição dos iões K^+ e H^+ nos meios intra e extracelular, com uma contribuição minoritária de outros sistemas de transporte, considerada através de um parâmetro de electrogeneidade (Electrogene). O potencial de equilíbrio do próton é dado pela Equação 7, utilizando dados experimentais de pH intra e extracelular e o potencial de equilíbrio do ião potássio é determinado pelas medidas de variação de concentração de K^+ extracelular, assumindo um valor inicial de potássio intracelular.

Equação 16: $V_m = g_H \times E_H + g_K \times E_K + Electrogene = (1 - g_K) \times E_H + g_K \times E_K + Electrogene$

Todos as parcelas da equação estão em volt. g_H e g_K são adimensionais e correspondem à contribuição relativa de cada ião para o potencial de membrana, variando o seu valor entre 0 e 1 ($g_H + g_K \approx 1$).

5.2. Cálculo de fluxos

Fluxo de Entrada de Glucose por Uniporte: considerando que a glucose é importada através de uniporte, o fluxo ($\text{moles.cm}^{-3}.\text{s}^{-1}$) de entrada é função da concentração extracelular de glucose e foi simulado considerando uma cinética simples de Michaelis-Menten (Gonçalves and Loureiro-Dias, 1994).

Equação 17: $J_{uniporte}^{Glu} = \frac{V_M^{Glu} [glucose]_{out}}{K_M^{Glu} + [glucose]_{out}}$

Em que o V_M^{Glu} ($\text{mol.cm}^{-3}.\text{s}^{-1}$) e o K_M^{Glu} (mol.cm^{-3}) são os parâmetros cinéticos do transportador, sendo a velocidade máxima de transporte e a constante de afinidade, respectivamente. A concentração extracelular de glucose é dada pelos dados experimentais, enquanto que para estimar os parâmetros foi feito um assentamento aos dados experimentais de variação desta concentração. Os parâmetros V_M^{Glu} e K_M^{Glu} assim obtidos entraram como estimativa inicial dos parâmetros no modelo dinâmico global.

Fluxo de Entrada/Saída de Protão: Quando a força electromotriz que actua nos protões não é nula, dá-se um fluxo de entrada/saída, de acordo com o sentido da força, fluxo (moles.cm⁻².s⁻¹) este descrito pela equação de Goldman Hodgkin and Katz (Macey and Moura, 1997):

$$\text{Equação 18: } J_{out \rightarrow in}^{H^+ \text{ Difusão}} = Perm_H \frac{\frac{zF}{RT} V_m}{e^{\frac{zF}{RT} V_m} - 1} ([H^+]_{in} \cdot e^{V_m} - [H^+]_{livre}]_{out})$$

Em que $Perm_H$ corresponde à permeabilidade da membrana ao H^+ (cm.s⁻¹), V_m o potencial de membrana (em volt), z à valência do protão, sendo F a constante de Faraday (C.mol⁻¹), R a constante dos gases perfeitos (J.mol⁻¹.K⁻¹) e T a temperatura (K). Esta equação é utilizada no modelo em duas etapas distintas. Numa primeira etapa estima-se a $Perm_H$, através de um assentamento dos dados experimentais de variação de pH_{out} , antes da introdução de pulsos de glucose, e utilizando medições experimentais de pH_{in} e um valor calculado de V_m , pela Equação 16. Numa segunda etapa, utiliza-se esta equação no modelo dinâmico para estimar os fluxos de protões observados ao longo do tempo, após adição do pulso de glucose, e utiliza-se o valor de $Perm_H$ aqui estimado como valor inicial do parâmetro no modelo dinâmico.

Fluxo de Saída de Protão pela H^+ -ATPase - Bomba: Este fluxo é descrito por uma equação simples a dois substratos de Michaelis-Menten (Rest et al., 1995), muito simplificada, em que foi assumida a estequiometria de 1 ATP: 1 H^+ .

$$\text{Equação 19: } J_{in \rightarrow out}^{H^+ \text{ Bomba}} = V_M^{Bomba} \left(\frac{[ATP]}{K_M^{ATP} + [ATP]} \right) \left(\frac{[H^+]_{in}}{K_M^{H^+} + [H^+]_{in}} \right)$$

Em que o V_M^{Bomba} é a velocidade máxima de transporte de protão (mol.cm⁻³.s⁻¹), o K_M^{ATP} e o $K_M^{H^+}$ são respectivamente a constante de afinidade para o ATP e para o protão (mol.cm⁻³). Aqui também $[H^+]_{in}$ é dada pelos dados experimentais de pH intracelular e o ATP é calculado pelo modelo. Esta equação é utilizada no modelo dinâmico para cálculo dos fluxos e estimativa dos parâmetros cinéticos.

Fluxo de reacções metabólicas: O modelo considera apenas a G6P como intermediário entre a glucose intracelular e o ATP produzido. As reacções de conversão foram todas consideradas de 1º ordem, com constantes de velocidade, k , com unidades (s⁻¹).

$$\text{Equação 20: } J^{Glu_{consumo}} = k_{fosf} [Glu]_{in}$$

$$\text{Equação 21: } J^{G6P_{consumo}} = k_{gli} [G6P]$$

5.3. Cálculo de Quantidades e Concentrações

Quantidades (moles): De forma a poderem ser determinadas as quantidades de protão, nutrientes e metabolitos nos compartimentos, ao longo do tempo, foi utilizado um conjunto de equações diferenciais. Para a construção destas equações, considerou-se que a variação da

quantidade, num dado compartimento, seria dada pela diferença entre a entrada (ou formação) e saída (ou consumo). A entrada e/ou saída foram calculadas através do produto do fluxo respectivo pelo volume do respectivo compartimento de partida. Os volumes interno e externo, v_{in} e v_{out} (cm^3), são considerados constantes ao longo da simulação. O volume v_{in} foi considerado o máximo volume imposto pela parede celular, visto as células estarem suspensas em meios de baixa osmolaridade (Soveral et al., 2008).

$$\text{Equação 22: } \frac{d}{dt}(Q_{out}^{H^+total}) = +J_{in \rightarrow out}^{H^+Bomba} \cdot v_{in} - J_{out \rightarrow in}^{H^+Difusão} \cdot A_{total}$$

$$\text{Equação 23: } \frac{d}{dt}(Q_{out}^{Glu}) = -J_{out \rightarrow in}^{Gluuniporte} \cdot v_{out}$$

$$\text{Equação 24: } \frac{d}{dt}(Q_{in}^{Glu}) = +J_{out \rightarrow in}^{Gluuniporte} \cdot v_{out} - J_{in}^{Gluconsumo} \cdot v_{in}$$

$$\text{Equação 25: } \frac{d}{dt}(Q^{G6p}) = +J_{in}^{Gluconsumo} \cdot v_{in} - J^{G6Pconsumo} \cdot v_{in}$$

$$\text{Equação 26: } \frac{d}{dt}(Q^{ATP}) = +2 \cdot J^{G6Pconsumo} \cdot v_{in} - J_{in \rightarrow out}^{H^+Bomba} \cdot v_{in} - J^{ATPconsumo} \cdot v_{in}$$

Concentrações ($\text{mol} \cdot \text{cm}^{-3}$): As concentrações em ambos os compartimentos, intra e extracelular, são determinadas ao longo das simulações, partindo das quantidades destes, nos volumes dos respectivos compartimentos.

$$\text{Equação 27: } [H^+]_{out} = Q_{out}^{H^+total} / v_{out}$$

$$\text{Equação 28: } [Glu]_{out} = Q_{out}^{Glu} / v_{out}$$

$$\text{Equação 29: } [Glu]_{in} = Q_{in}^{Glu} / v_{in}$$

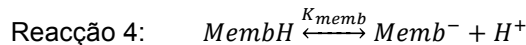
$$\text{Equação 30: } [G6P] = Q^{G6p} / v_{in}$$

$$\text{Equação 31: } [ATP] = Q^{ATP} / v_{in}$$

A concentração intracelular de protão, correspondente à variação do pH intracelular, foi determinada através de medidas experimentais de pH_{in} ao longo do tempo.

5.4. Propriedades ácido-base da membrana

A variação da quantidade total de protões externos (mol) calculada pela Equação 22 contabiliza quer os protões livres em solução que causam uma variação do pH_{out} quer os protões envolvidos nas propriedades ácido-base da membrana. Assumindo que a membrana celular apresenta apenas um grau de protonação, considerou-se a seguinte reacção:



Em que MembH e Memb⁻ são as formas protonadas e desprotonadas da membrana e K_{memb} é respectiva constante de dissociação, dada pela Equação 32.

$$\text{Equação 32: } K_{memb} = \frac{[Memb^-] \cdot [H_{livre}^+]_{out}}{[MembH]}$$

Pela princípio de conservação de massa (Equação 33) pode determinar-se a concentração de membrana protonada (Equação 34):

$$\text{Equação 33: } [M_T] = [MembH] + [Memb^-]$$

$$\text{Equação 34: } [MembH] = \frac{[M_T] \cdot [H_{livre}^+]_{out}}{K_{memb} + [H_{livre}^+]_{out}}$$

A partir da concentração total de prótons e da concentração de prótons ligados à membrana (Equação 35), pode determinar-se a concentração de prótons livres e (Equação 36) e a partir desta o pH_{out} .

$$\text{Equação 35: } [H^+_{ligado}]_{out} = [MembH]$$

$$\text{Equação 36: } [H^+_{livre}]_{out} = [H^+_{total}]_{out} - [H^+_{ligado}]_{out}$$

Estas equações foram utilizadas para estimar as propriedades ácido base da membrana (pK_{memb} , M_T e concentração inicial de membrana protonada MH_0) utilizando os dados experimentais obtidos quando quantidades conhecidas de HCl foram adicionadas a suspensões celulares antes da adição de qualquer pulso de glucose. Estes parâmetros e a condição inicial MH_0 , foram utilizados no modelo global, assim com as equações no cálculo da variação de pH extracelular após um pulso de glucose.

III. RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Parâmetros de crescimento *S. cerevisiae*

Os parâmetros de crescimento, em particular a taxa de específica de crescimento, μ , (Equação 3) e tempo de duplicação (Equação 4), foram determinados para as condições de crescimento celular (volumes e locais, CBAA-ISA, UTL e REQUIMTE-FCT, UNL) já especificados anteriormente. Assim, na Figura 15 encontram-se apresentadas as curvas de crescimento da estirpe *Saccharomyces cerevisiae* IGC 3507-III.

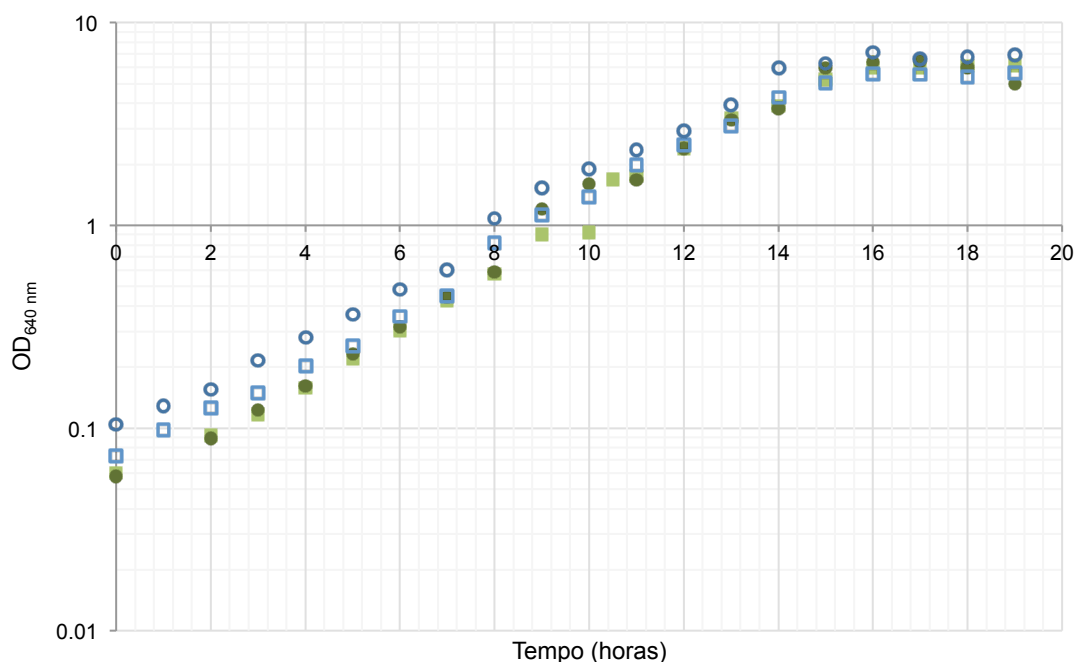


Figura 15: Curvas de crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* IGC 3507-III em meio K, com agitação orbital a 180 rpm e 28°C, com diferentes volumes de cultura. ■ 125 mL e ● 1 litro, CBAA-ISA, UTL, □ 125 mL e ○ 1 litro, REQUIMTE-FCT, UNL.

Pela análise da Figura 15 pode verificar-se que as curvas possuem formas idênticas, quer para diferentes volumes de cultura, quer para os diferentes locais (CBAA-ISA, UTL e REQUIMTE-FCT, UNL) onde foram realizados os crescimentos. As curvas de crescimento realizadas na FCT encontram-se com OD ligeiramente superiores ao longo de toda a curva, o que se deve ao facto de estas terem sido inoculadas com uma OD ligeiramente superior.

Tabela 11: Taxa específica de crescimento e tempo de duplicação, para as diferentes culturas.

Local de crescimento		CBAA-ISA, UTL		REQUIMTE-FCT, UNL	
Volume de cultura	(mL)	250	1000	125	1000
Taxa específica de crescimento	(h ⁻¹)	0.33	0.32	0.34	0.32
Tempo de duplicação	(h:min)	2:07	2:08	2:04	2:10

Através dos dados obtidos, foram determinadas as taxas específicas de crescimento e os respectivos tempos de duplicação, apresentados na Tabela 11. Os tempos de duplicação foram sempre de cerca de 2 horas, havendo variação entre as diferentes culturas de apenas alguns minutos. Este facto indica que as células se encontram nas mesmas condições para o crescimento.

2. Determinação do peso seco e volume interno

Os pesos secos dos diferentes ensaios foram obtidos como descrito no ponto II-1.5 e encontram-se na Tabela 12. Estes são determinados a partir da massa medida para uma alíquota de 200 μL (V_{aliquota}) da suspensão celular com OD 10 utilizando a Equação 37.

$$\text{Equação 37: } \text{Peso seco (mg.mL}^{-1}\text{)} = \frac{\text{Peso seco (mg)}}{V_{\text{aliquota}} \text{ (mL)}}$$

Estas células possuem um volume interno ($V_{\text{in_cel}}$) de $2.2 \mu\text{L.mg}^{-1}$ (peso seco). Sabendo o peso seco em cada em ensaio (em mg.mL^{-1}) e o volume de suspensão celular (V_{susp}) (mL), é possível determinar o volume interno total (V_{in}) da solução (Equação 38).

$$\text{Equação 38: } V_{\text{in}} = V_{\text{in_cel}} \times (\text{Peso seco} \times V_{\text{susp}})$$

Em diversos estudos é comum assumir-se que estas células possuem uma forma esférica. O raio da célula é de $1.73 \times 10^{-4} \text{ cm}$ (Soveral et al., 2007), sendo a área da membrana celular (A_{cel}) dada pela Equação 39. A área contabilizada para a totalidade das células (A_{total}), assim como o número de células correspondente, são dadas pela Equação 40 e 41.

Em diversos estudos é comum assumir-se que estas células possuem uma forma esférica, facilitando cálculos e simulações. Desta forma e sendo que o raio de uma célula descrito na literatura é de $1.73 \times 10^{-4} \text{ cm}$, é possível determinar a área total (A_{total}) das células (tendo em conta os dados referidos no parágrafo anterior). As equações que permitem determinar estes valores, em que A_{cel} corresponde à área de uma única célula e N_{cel} corresponde ao número de células, são:

$$\text{Equação 39: } A_{\text{cel}} = 4\pi \text{Raio}^2$$

$$\text{Equação 40: } N_{\text{cel}} = \frac{V_{\text{in}}}{V_{\text{in_cel}}}$$

$$\text{Equação 41: } A_{\text{total}} = A_{\text{cel}} \times N_{\text{cel}}$$

Tabela 12: Pesos secos, volume interno, área e número de células nos diferentes ensaios. * Ensaios obtidos após a adição de um pulso de glucose. ** Apenas aplicável aos ensaios de radioatividade de ^{14}C , após adição de um pulso de glucose.

Ensaio	Variação $[\text{K}^+]_{\text{out}}$ *	Variação $[\text{TPP}^+]_{\text{out}}$ *	Variação pH_{in} **	Variação pH_{out} *	Poder tampão da membrana	Permeabilidade	Doseam. $[\text{Glucose}]_{\text{out}}$
Peso seco ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	0.35	0.1	0.375	0.225	0.425	0.225	0.325
V_{susp} (mL)	1.5	1.5	8	0.4	0.5	0.4	2
A_{total} (cm^2)	8.90	2.54	50.9	1.53	3.60	1.53	11.0
N_{cel}	9.47×10^7	2.71×10^7	5.41×10^8	1.62×10^7	3.83×10^7	1.62×10^7	1.17×10^8
V_{in} (cm^3)	1.16×10^{-3}	3.30×10^{-4}	6.60×10^{-3}	1.98×10^{-4}	4.68×10^{-4}	1.98×10^{-4}	1.43×10^{-3}

3. Determinação dos parâmetros cinéticos de entrada de glucose

Considerando que a entrada de glucose segue uma cinética de Michaelis-Menten (Equação 8), foi feito um ajuste aos dados experimentais obtidos para uma concentração inicial de glucose de 11 mM e determinados os parâmetros cinéticos de velocidade máxima (V_M^{Glu}), e a constante de afinidade para a glucose (K_M^{Glu}) e foi estimado o valor inicial de concentração de glucose (Glu_{init}) (Tabela 13 e Figura 16-A).

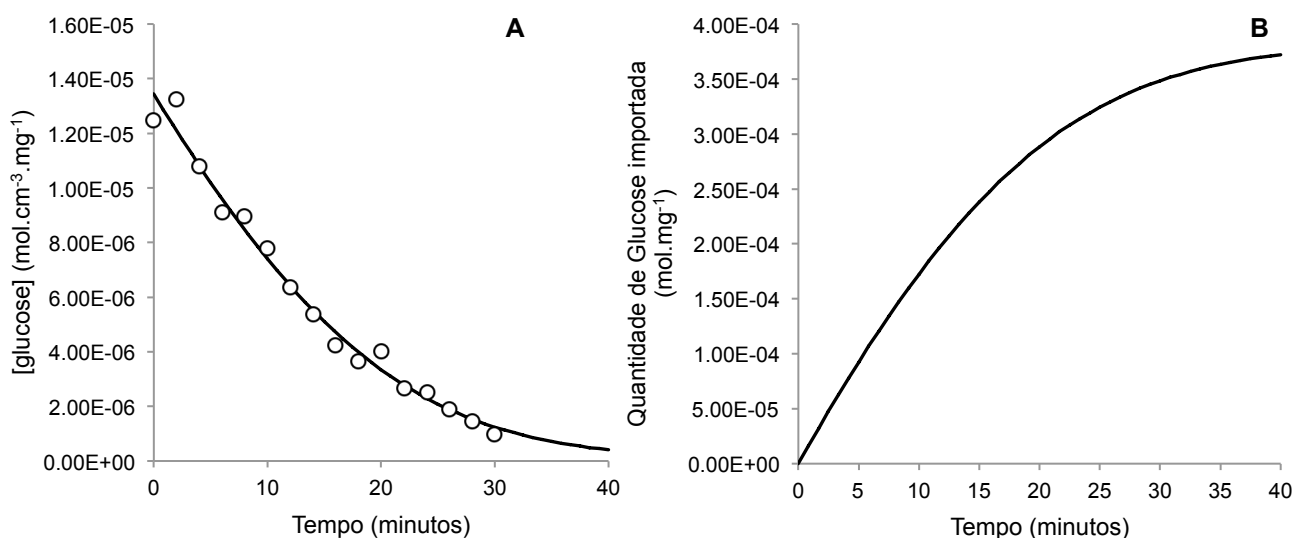


Figura 16: A- Dados experimentais de glucose extracelular (O) e o respectivo ajuste (—). B- Curva representativa da quantidade de glucose importada para o meio intracelular. Em ambas as figuras os dados encontram-se normalizados para o peso seco do ensaio, em mg.

Observando o decréscimo de glucose no meio extracelular verifica-se que a glucose é totalmente consumida ao fim de 30 minutos. Os dados originais respeitantes às figuras apresentadas nesta secção encontram-se em Anexo.

Tabela 13: Constantes cinéticas e concentração inicial obtidas através do ajuste aos dados experimentais de glucose extracelular.

		Unidades
V_M^{Glu}	2.00×10^{-8}	$(\text{mol} \cdot \text{cm}^{-3} \cdot \text{s}^{-1})$
	2.00×10^{-2}	$(\text{mM} \cdot \text{s}^{-1})$
K_M^{Glu}	1.00×10^5	$(\text{mol} \cdot \text{cm}^{-3})$
	10	(mM)
Glu_{init}	1.34×10^{-5}	$(\text{mol} \cdot \text{cm}^{-3})$
	13.4	(mM)

Dado a concentração inicial de glucose colocada no ensaio ter sido de 11 mM e o valor experimental estimado de 13.4 mM, optou-se por utilizar o valor estimado no modelo, visto poderem ter ocorrido erros experimentais, quer no manuseamento da amostra de glucose, quer na preparação da própria solução de glucose inicial a adicionar ao ensaio (111 mM, que corresponde a uma concentração de 2%, diluída na proporção de 1:10 no volume final do ensaio).

4. Variação do pH extracelular após a adição de um pulso de glucose

Para os estudos de variação de pH extracelular após adição de um pulso de glucose, foram realizados três ensaios independentes, tendo um deles a duração de apenas cerca de 26 minutos. Os dois ensaios restantes foram ambos realizados durante cerca de 40 minutos, pelo que se optou por utilizar um valor médio de ambos os ensaios, que se encontra apresentado na Figura 17, juntamente com o desvio padrão correspondente à determinação do valor médio dos ensaios.

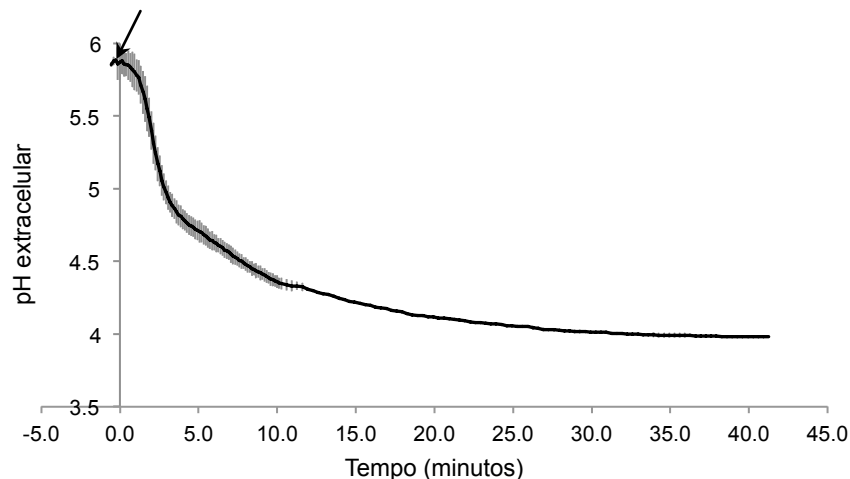


Figura 17: Curva representativa da variação de pH extracelular, correspondente a dois ensaios, com respectivo desvio padrão (representado a cinza). A seta indica o momento em que foi adicionada a glucose. As curvas de variação de pH extracelular foram obtidas com uma sensibilidade de 0.5 e uma velocidade de papel de 3 $\text{cm} \cdot \text{min}^{-1}$.

Analisando a Figura 17, pode verificar-se que o pH extracelular não desce imediatamente, o que se deve ao facto ser necessário algum tempo para que a glucose seja importada, metabolizada e dando origem à formação das primeiras moléculas de ATP, necessárias ao funcionamento da bomba. Após esta fase inicial observa-se uma grande variação do pH extracelular, até estabilizar quando a quantidade de glucose extracelular disponível é muito diminuta.

4.1. Propriedades ácido base da membrana: determinação de pKs

A partir dos dados da titulação da membrana, variação do pH extracelular após adição de quantidades conhecidas de HCl, foram determinadas: concentração de prótons livres em solução (H^+_{livres}), calculados directamente dos valores de pH extracelular, concentração total de prótons (H^+_{totais}), determinada através das quantidades de H^+ adicionadas em cada passo e a concentração de prótons ligados à membrana (H^+_{ligados}), correspondentes à diferença entre os prótons totais e os prótons livres em solução.

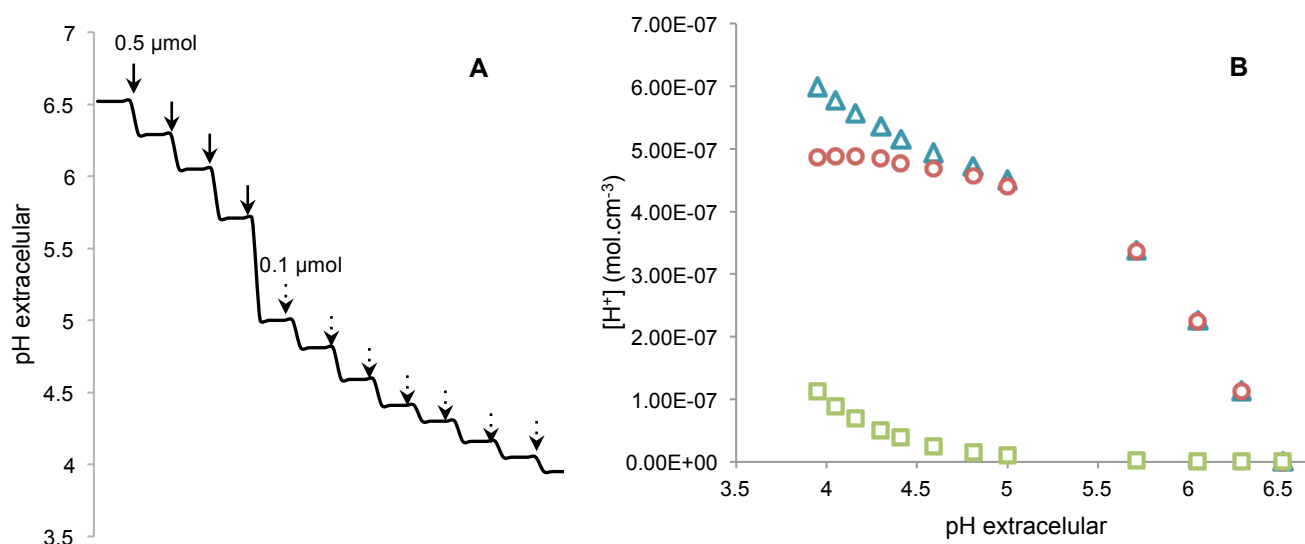


Figura 18: A – Variação do pH extracelular com a adição de pulsos de HCl (as setas indicam o momento de adição dos pulsos de HCl; as setas a cheio representam a adição de 0.5 μmol enquanto que as setas a tracejado indicam a adição de 0.1 μmol de HCl). B - Variação da concentração extracelular de prótons em função do pH extracelular. ■ $[H^+_{\text{livres}}]$, ▲ $[H^+_{\text{totais}}]$, e ● $[H^+_{\text{ligados}}]$.

Tendo em conta as equações descritas no ponto II-5.4, foi efectuado um ajuste aos dados experimentais relativos à concentração de prótons ligados e estimados os parâmetros apresentados na Tabela 14. Na Figura 19 está representado, não só o ajuste aos dados experimentais, curva *b* (dados representados por ● na Figura 18), mas também outras duas curvas: a curva *a* corresponde à titulação que seria obtida no caso de ter sido iniciada a pH 14, ou seja, antes de haver qualquer tipo de protonação da membrana, enquanto que a curva *c* corresponde ao comportamento que seria obtido caso a titulação fosse iniciada ao pH máximo medido para o ensaio após adição de glucose, pH 5.88. No caso da curva *c*, como se está a simular o início da titulação ao pH do ensaio, é possível estimar a quantidade de membrana que estaria já protonada a esse valor de pH, designada por MH_0 .

Tabela 14: Parâmetros determinados através dos ajustes à concentração de prótons ligados à membrana.

pK_{memb}	MH_0 (mol.cm ⁻³)	M_T (mol.cm ⁻³)
6.38	6.32×10^{-7}	4.17×10^{-7}

Através das equações já descritas e do ajuste representado na curva *b*, é possível estimar uma constante de protonação (Tabela 14) e a quantidade de membrana total (M_T), que está relacionada com o peso seco do ensaio e dependente da área total de membrana que é possível protonar. Todos estes parâmetros são utilizados no modelo global, alguns como parâmetros iniciais que serão ajustados aos novos dados (MH_0 e M_T) e o pK_{memb} , como constante fixa.

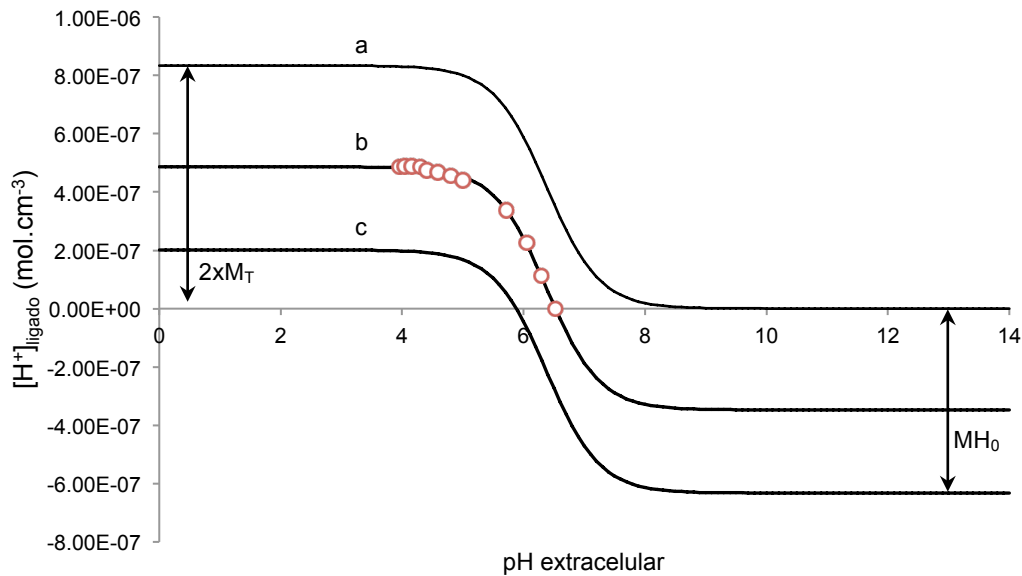


Figura 19: a) Simulação da curva de titulação da membrana com início a pH 14 (—). b) Curva de titulação ajustada (ajuste representado por —) aos dados experimentais (●) apresentados na Figura 18. c) Simulação (—) da curva de titulação com os dados experimentais (◇) tratados de forma a começar no pH de início dos ensaios de pH extracelular (pH 5.88).

4.2. Calibração dos dados de pH extracelular

Utilizando os dados experimentais apresentados na Figura 18, relativos à concentração total de prótons, determinados pela adição de HCl e sabendo o pH medido correspondente, é possível estimar uma relação entre estes dois valores, ajustando uma equação (Equação 42) que descreva o comportamento dos dados de variação da concentração total de prótons adicionados em função do pH medido (Figura 20, curva a).

$$\text{Equação 42: } [H^+]_{\text{total}} = -5.813 \times 10^{-8} \times pH^3 + 8.3735 \times 10^{-7} \times pH^2 - 4.127 \times 10^{-6} \times pH + 7.420 \times 10^{-6}$$

No entanto, a Equação 42 descreve o comportamento de uma curva com início a pH 6.5, que não é o caso dos ensaios de variação de pH após adição de pulso de glucose (pH 5.88). Assim, tendo em conta que não estavam disponíveis dados experimentais especificamente ao pH extracelular de interesse, determinou-se, utilizando a Equação 42, a concentração total de prótons

para o valor de pH_{out} de 5.88. Esse valor foi subtraído aos dados experimentais da curva *a* de forma a deslocar a curva para um pH inicial de 5.88, ajustando novamente os dados para uma nova equação, Equação 43.

Equação 43: $[H^+]_{total} = -5.813 \times 10^{-8} \times pH^3 + 8.374 \times 10^{-7} \times pH^2 - 4.128 \times 10^{-6} \times pH + 7.135 \times 10^{-6}$

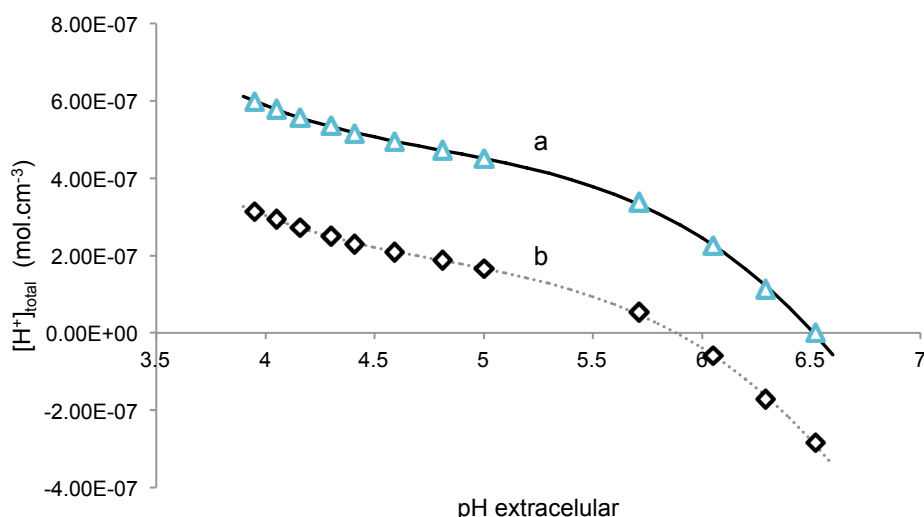


Figura 20: a) Ajuste (\triangle) aos dados experimentais de prótons totais em solução (—), apresentados na Figura 18. b) Ajuste (—) aos dados experimentais (\diamond) tratados de forma a começar no pH de início dos ensaios (pH 5.8).

Através deste ajuste (Equação 43) foi possível determinar a concentração total de prótons no compartimento extracelular, devido à actuação da bomba, correspondentes ao pH_{out} medido (Figura 17). Estes prótons totais dividem-se entre prótons livres, que fazem variar o pH, e prótons ligados, correspondentes à membrana protonada. Utilizando a Equação 43 para calibrar todos os dados de pH_{out} obtém-se três conjuntos de dados relativos à variação temporal da concentração extracelular de H^+ : prótons livres, totais e ligados. As três curvas apresentadas na Figura 21 correspondem aos dados utilizados para ajuste no modelo global.

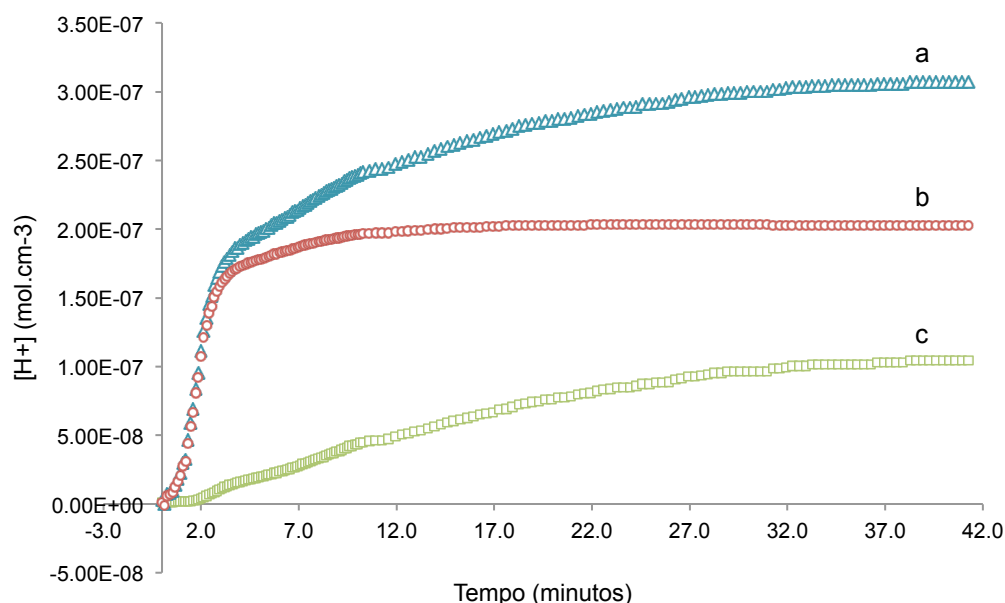


Figura 21: a) Curva experimental de $[H^+]_{total}$ (\triangle) calibrada a partir da Equação 43 e dos dados de pH extracelular. b) Curva experimental de $[H^+]_{ligados}$ (\circ), determinados directamente pela diferença entre os prótons totais e os prótons livres. c) Curva experimental de $[H^+]_{livres}$ (\square), determinados directamente do pH extracelular.

5. Variação do pH intracelular após adição de um pulso de glucose

5.1. Microscopia de Fluorescência

A adesão das células às placas é muito importante para o método de perfusão. De acordo com a literatura (Breeuwer and Abee, 2000), a utilização de poli-L-lisina (PLL) é pouco eficiente em células de *S. cerevisiae*. Assim, optou-se por testar este *coating*, com PLL a 0.01%, e gelatina a duas concentrações, 1 e 5%, utilizando o método de perfusão. Verificou-se que, com 1% de gelatina as células se encontram bem espalhadas (Figura 22-A e B) mas a maioria pouco aderente quando se

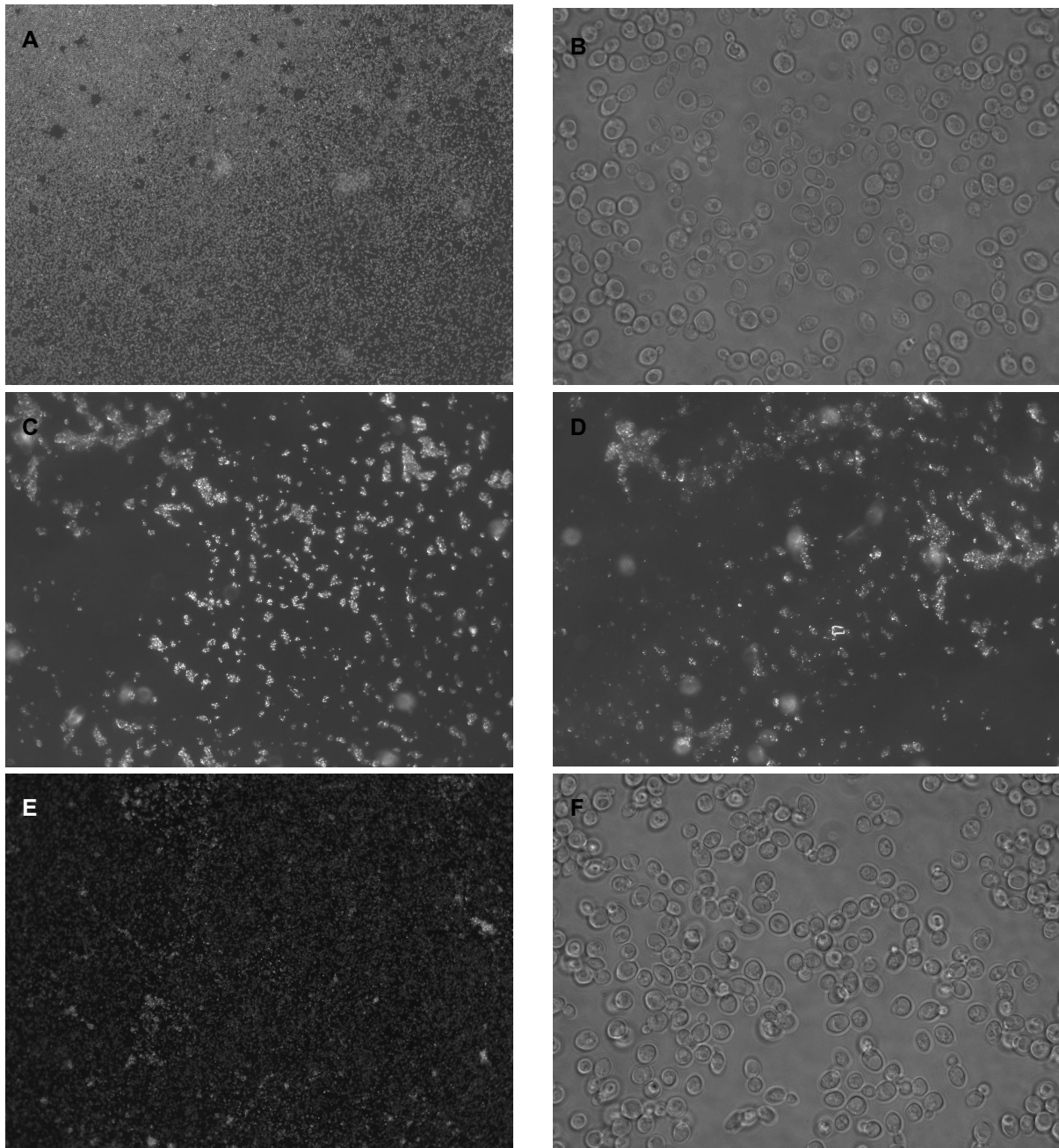


Figura 22: Aspecto das células com *coating* de gelatina a 1%, (A) com uma ampliação de 10x e (B) com uma ampliação de 100x. Nas placas em que foi utilizado *coating* de gelatina a 5% (C e D) foi possível observar aglomerados em dois campos de visão distintos. Nos painéis inferiores é possível observar o aspecto das células de *S. cerevisiae* utilizando placas com *coating* de PLL 0.01%, (E) com uma ampliação de 10x e (F) com uma ampliação de 100x.

inicia a perfusão, mesmo após 1 hora de incubação, verificando-se o mesmo com 5% de gelatina. A esta última concentração verificou-se também que as células não se encontravam tão bem espalhadas, formando agregados (Figura 22-C e D). Com o *coating* de PLL a 0.01% verificou-se que havia também alguns agregados, mas no geral as células encontravam-se bem espalhadas pela placa (Figura 22-E e F) e que estas se mantinham fixas quer após adição de solução directamente por cima da placa, utilizando uma pipeta, quer após início de perfusão. Assim, optou-se pela utilização de PLL a 0.01%, para a adesão celular às placas de Petri.

Como descrito no ponto II-4.1, o pH intracelular foi determinado por fluorescência, recorrendo à sonda fluorescente cFDA. Na Figura 23-A encontra-se representada a média dos sinais de rácio de intensidade de fluorescência obtidos para células no campo de visão (os sinais individuais encontram-se apresentados em Anexo). Em todos os ensaios, para a monitorização do rácio individual das células foram escolhidas células isoladas no campo de visão, com base na comparação entre a imagem obtida por fluorescência (Figura 23-B) e uma imagem idêntica obtida no visível (Figura 23-C). O comprimento de onda de excitação que reflete variações de pH corresponde a 495 nm. Assim, quando há um aumento da emissão a 520 decorrente da excitação a 495 nm há uma diminuição do rácio (440 nm/ 495 nm). Pela análise da figura verifica-se que há uma diminuição

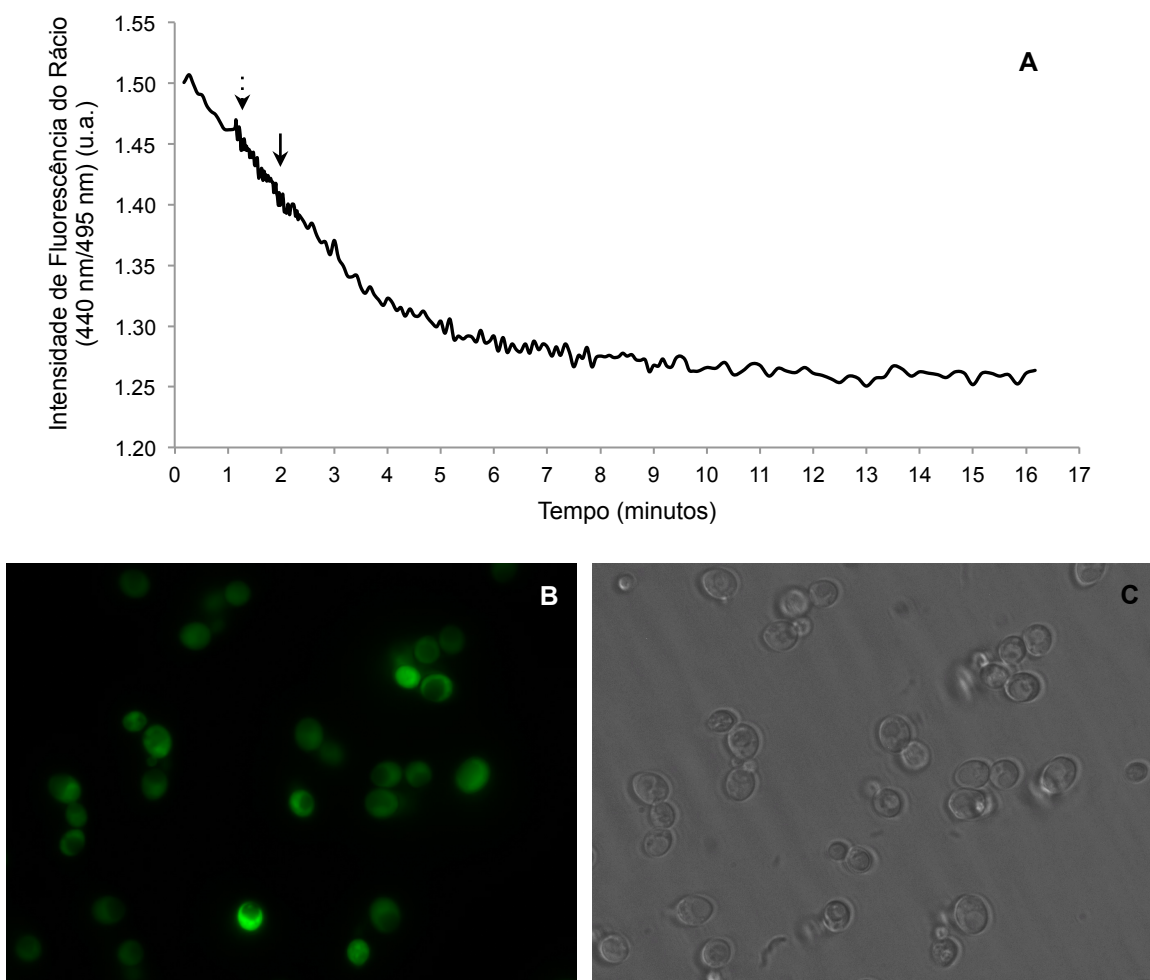


Figura 23: A - Sinal correspondente ao rácio médio 440 nm/ 495 nm, observado após um pulso de glucose, para todas as células fluorescentes no campo de visão (B). A seta a tracejado indica a alteração no tempo de exposição e a seta a cheio indica a adição de glucose 11 mM. *Saccharomyces cerevisiae* apresentando fluorescência (B), obtida com 100 ms de exposição, ganho 2x, e a mesma imagem obtida no visível (C), ambas obtidas com uma objectiva de 100x e uma ampliação extra de 1.6x.

do rácio de intensidade de fluorescência após adição do pulso de glucose o que, só após calibração se pode aferir se corresponde a subida ou descida de pH. Ainda na Figura 23-A, é possível observar-se que antes da adição do pulso de glucose o sinal apresentava já uma tendência de descida, consistente em todos os ensaios. Esta descida poderia corresponder ao efeito de *photo bleaching*, que corresponde à destruição fotoquímica do fluoróforo por repetida exposição a luz. Para testar a hipótese de ter ocorrido este efeito aumentou-se a frequência de excitação/aquisição (alteração indicada pela seta a tracejado da Figura 23-A). Com esta alteração o efeito observado deveria acentuar-se, caso fosse reflexo de um efeito de *photo bleaching*. No entanto isto não se verificou, o que leva a crer que a diminuição constante do sinal de fluorescência poderá reflectir uma alteração constante de pH intracelular ou saída de sonda para o meio extracelular. Nestes ensaios, as células foram colocadas na câmara de perfusão com solução tampão citrato-fosfato a pH 5 antes da adição de glucose e, no momento de início da aquisição, as células poderiam ainda estar a equilibrar o seu pH interno com o pH extracelular. Devido ao facto de a solução tampão ter sido adicionada às células e então ter sido preparada toda a montagem experimental, seria de prever que as células tivessem tempo suficiente de equilibrar o seu pH intracelular com o pH da solução exterior. No entanto, verificando-se esta descida e não podendo saber com exactidão a sua causa não é possível excluir nenhuma das hipóteses. Para calibrar o sinal obtido após adição de um pulso de glucose, foram realizados dois tipos de calibração: *in vivo* e *in vitro* propostas por Breeuwer e Abee (Breeuwer and Abee, 2000).

CALIBRAÇÃO IN VIVO

Calibrou-se o sinal de rácio de intensidade de fluorescência através da adição de soluções tampão a diferentes valores de pH com e sem 2% de ácido acético, verificando a correspondente variação do sinal. De acordo com este método, o ácido acético distribui-se e dissocia-se nos meios intra e extracelular, igualando o pH interno ao externo. Desta forma, seria possível ajustar os resultados utilizando a equação de Henderson-Hasselbalch (

Equação 44), adaptada aos dados. A forma de obter um controlo é utilizar células mortas ou não-viáveis no campo de visão.

$$\text{Equação 44: } pH = pK_{CFDA} + \log \left(\frac{Ratio - Ratio_{min}}{Ratio_{max} - Ratio} \right)$$

Para estes ensaios de calibração as células foram perfundidas com as soluções tampão, como descrito. Os dados experimentais relativos à perfusão de soluções tampão a diferentes valores de pH sem ácido acético encontram-se na Figura 24. Optou-se por não apresentar nesta secção os dados relativos à perfusão de soluções tampão com 2% de ácido acético, visto os resultados serem muito semelhantes. Assim observou-se, tal como referenciado na literatura (Breeuwer and Abee, 2000), que os dados obtidos para a perfusão de células de *S. cerevisiae* com soluções tampão com e sem ácido acético são idênticos.

Ao contrário do que se encontra referenciado pelos autores Breeuwer e Abee (Breeuwer and Abee, 2000), não foi possível visualizar células mortas ou não-viáveis. Todas as células

monitorizadas apresentavam um sinal semelhante, pelo que não foi possível distinguir células viáveis de não viáveis ou auferir a presença destas últimas.

De forma a verificar um possível choque osmótico, passível de interferir com o sinal de pH, mediram-se as osmolaridades das soluções utilizadas. Assim, as soluções tampão sem ácido acético possuem osmolaridades entre 397 e 440 mosm/kg, enquanto que as soluções com ácido acético se encontram entre 980 e 1170 mosm/kg (dados apresentados em Anexo). Estes valores de osmolaridade são elevados e podem criar um choque osmótico e influenciar o sinal obtido. Assim, analisou-se a composição das soluções e optou-se por utilizar soluções tampão inorgânicas (Gomori, 1955), que não contivessem KCL, glucose ou glicina. A glicina, presente nas soluções da literatura (Breeuwer and Abee, 2000), possui um transportador membrana (Rest et al., 1995) e, mesmo não sendo metabolizada, pode influenciar o pH intracelular. Quanto à glucose e ao KCl, como já foi referido noutras secções, ambos podem ser transportados para o meio intracelular e influenciar também o sinal de pH. As soluções tampão inorgânicas utilizadas foram preparadas de acordo com a literatura (Gomori, 1955) e efectuada a calibração *in vivo* como descrito. O sinal de rácio de intensidade de fluorescência obtido encontra-se apresentado na Figura 25-A. Pela análise deste sinal

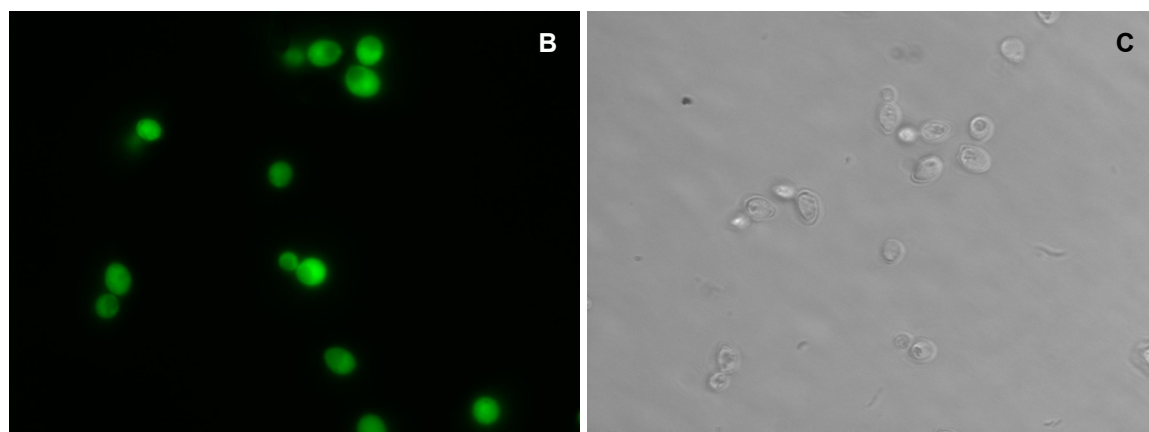
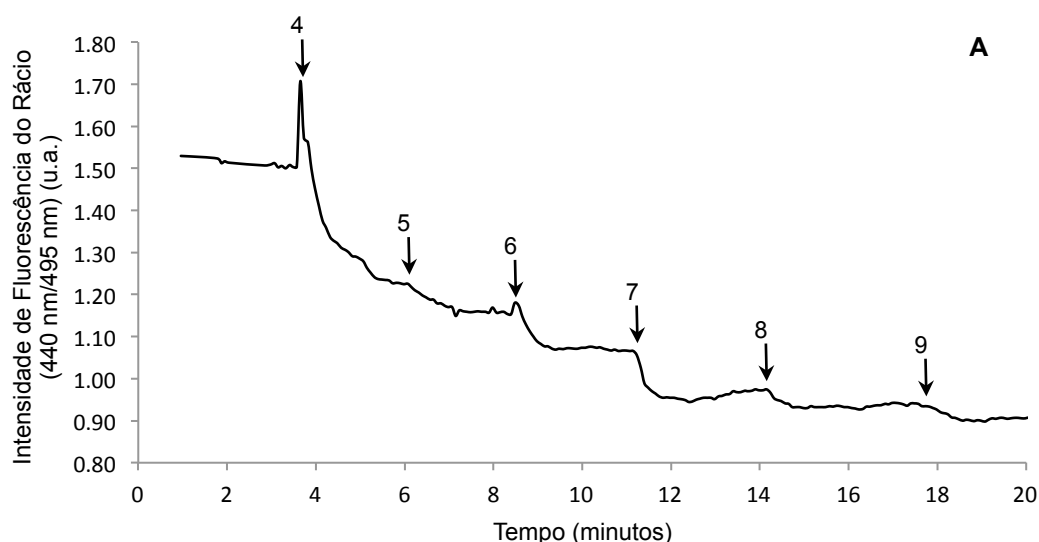


Figura 24: A - Calibração *in vivo* com soluções tampão a diferentes valores de pH, sem ácido acético (preparadas de acordo com (Breeuwer and Abee, 2000)), observado para todas as células fluorescentes no campo de visão (B). *Saccharomyces cerevisiae* apresentando fluorescência (B), obtida com 100 ms de exposição, ganho 2x, e a mesma imagem obtida no visível (C), ambas obtidas com uma objectiva de 100x e uma ampliação extra de 1.6x. As setas indicam o momento de início da adição, por perfusão, das soluções aos valores de pH indicados.

é possível verificar que o rácio decresce com o aumento do pH. No entanto, observou-se que o rácio máximo obtido para a calibração é menor que o rácio obtido para o ensaio com adição de glucose, pelo que estes não podem ser utilizados para a calibração do sinal de rácio de intensidade de fluorescência obtido após adição de glucose.

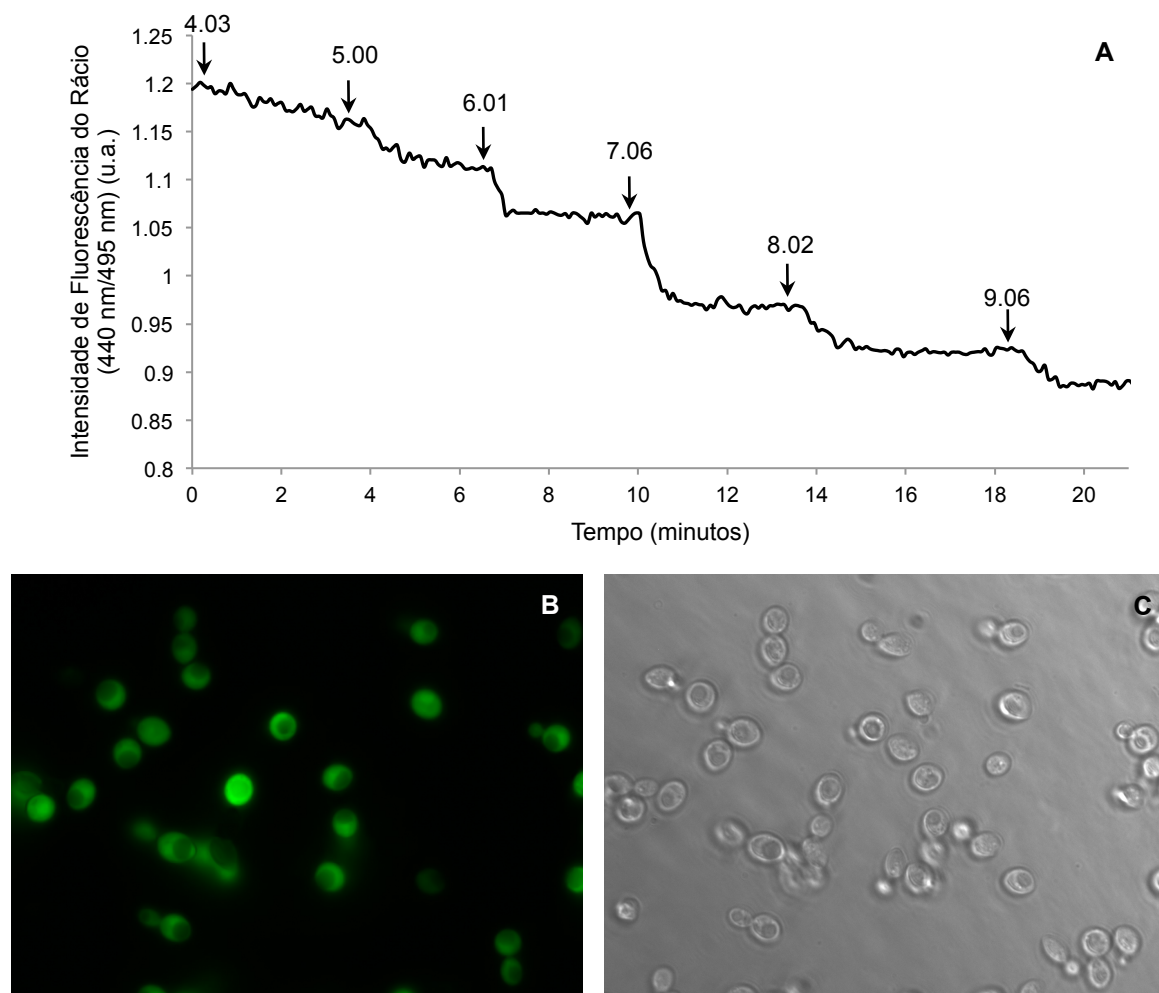


Figura 25: A - Calibração *in vivo* com soluções tampão a diferentes valores de pH, sem ácido acético (preparadas de acordo com (Gomori, 1955)), observado para todas as células fluorescentes no campo de visão (B). *Saccharomyces cerevisiae* apresentando fluorescência (B), obtida com 100 ms de exposição, ganho 2x, e a mesma imagem obtida no visível (C), ambas obtidas com uma objectiva de 100x e uma ampliação extra de 1.6x. As setas indicam o momento de início da adição, por perfusão, das soluções aos valores de pH indicados.

CALIBRAÇÃO IN VITRO

A calibração *in vitro* foi também realizada como descrito na literatura (Breeuwer and Abee, 2000), utilizando o mesmo método de perfusão, com a câmara de fluxo fechada, mas com uma lamela sem células. As soluções utilizadas continham cFDA já hidrolisada (cF) e na sua forma fluorescente, para que cada sinal de intensidade de fluorescência corresponda a um valor de pH. O sinal apresentado na Figura 26-C foi obtido realizando uma média de rácios obtidos para regiões escolhidas aleatoriamente dentro do campo de visão. Através da análise deste sinal é também possível concluir que um decréscimo no rácio corresponde a um aumento do pH das soluções. No

entanto, os dados obtidos para esta calibração não foram obtidos nas mesmas condições que para o ensaio com adição do pulso de glucose: os dados de ambos foram obtidos com um tempo de exposição de 100 ms, mas a calibração foi obtida com ganho 1x, metade do ganho do ensaio com adição do pulso de glucose, dado que com ganho 2x se observou saturação de sinal logo após adição de solução a pH 4. Desta forma pode concluir-se que não é correcto utilizar nenhuma das calibrações realizadas para calibrar os dados obtidos para o ensaio de variação de pH interno após adição de um pulso de glucose. No caso da calibração *in vivo* os do ensaio após adição de um pulso de glucose estão fora dos limites observados para a calibração. Este facto indica também que as soluções utilizadas podem não servir para calibrar o sinal, uma vez que, mesmo que os dados do ensaio se encontrassem ligeiramente dentro dos limites da calibração, o pH intracelular nunca pode variar numa gama tão alargada. No caso da calibração *in vitro* os dados não foram obtidos nas mesmas condições dos ensaios e não é correcto fazer uma correspondência entre as duas condições. Ainda assim, através da Figura 21 e do pH das soluções utilizadas (correspondente ao pH intracelular), é possível determinar o pK_a da cFDA, utilizando também o Rácio determinado (apresentado na Figura 21 -D) e o $R_{\text{mín}}$ e $R_{\text{máx}}$, correspondendo ao rácio em condições de pH muito elevado e muito baixo, respectivamente. Foi possível ajustar os dados obtidos com esta equação, obtendo inclusive valores de pK_a de 6.47 e 5.37, para a calibração *in vivo* e *in vitro*, respectivamente, sendo que o pK_a da calibração *in vivo* corresponde exactamente ao valor descrito na literatura (Breeuwer and Abee, 2000) e próximo ao descrito por outros autores (Sjoberg et al., 1995, Aschi et al., 2008, Massou et al., 2000).

Assim, apesar de não ser possível calibrar os dados de intensidade de rácio obtido para o ensaio de variação do pH intracelular após um pulso de glucose, observando os dados obtidos para ambas as calibrações, pode dizer-se que o pH intracelular aumenta, após adição de um pulso de glucose.

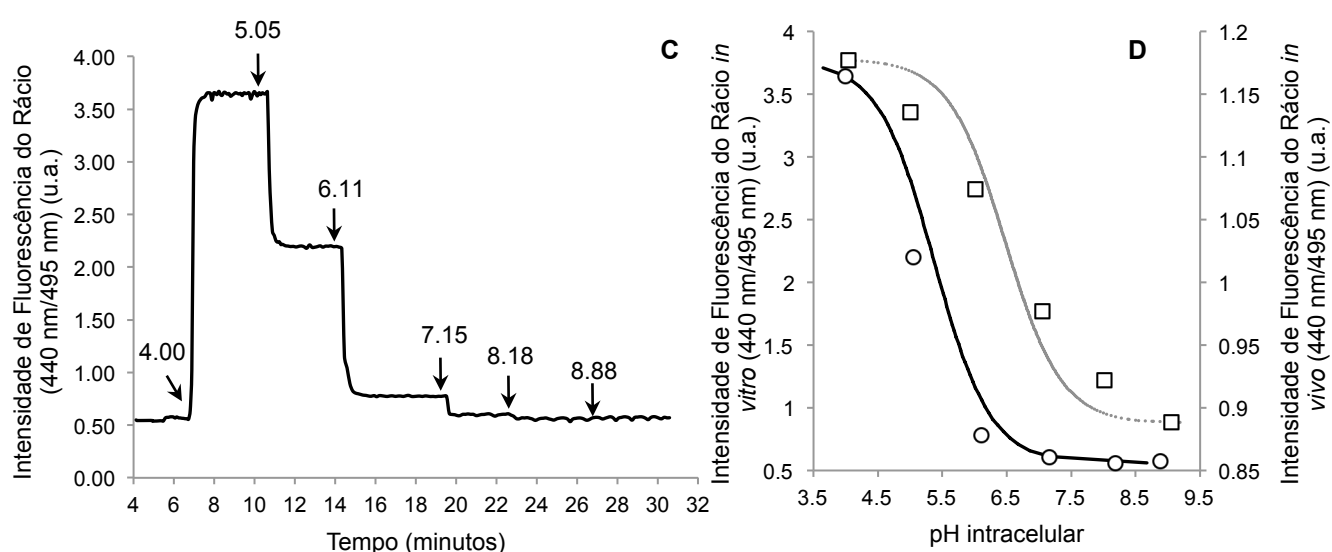


Figura 26: C - Sinal correspondente ao rácio 440 nm/ 495 nm observado para a perfusão das soluções de cFDA hidrolisada a diferentes valores de pH, obtido com 100 ms exposição e ganho 1x. D – Dados experimentais médios de rácio 440 nm/495 nm, *in vivo* (□) e *in vitro* (○), obtidos a partir dos dados apresentados no panel C e na Figura 23-A, e respectivos ajustes (..... e —) utilizando a Equação 44. As setas indicam o momento de início da adição, por perfusão, das soluções aos valores de pH indicados.

5.2. Marcação com isótopos radioactivos

A determinação do pH intracelular a partir da incubação de células com isótopos radioactivos é um método de medição mais directo e que não necessita de calibração, visto o pH intracelular ser determinado directamente através dos valores contagem das cintilações obtidos, como já foi explicado detalhadamente no II-4.2. Na Figura 27-A são apresentados os dados relativos à variação do pH intracelular ao longo do tempo. Estes dados foram obtidos em 3 fases diferentes do ensaio: logo após a adição de glucose (0 minutos), aos 10, 20 e 30 minutos e no final, quando o pH extracelular já se encontra mais baixo e as células já consumiram (quase) a totalidade da glucose extracelular. Os dados originais são apresentados em Anexo. Na Figura 27-B estão apresentados os mesmos dados de pH intracelular, mas agora em função do pH extracelular medido para vários instantes do ensaio. Também estes valores são pontos médios de vários dados experimentais, pelo que os dados originais se encontram apresentados em Anexo. Aos dados da Figura 27-B foi ajustado um polinómio de segundo grau (Equação 45) que permitiu descrever a variação do pH intracelular com a variação do pH extracelular, medidos nos ensaios após adição do pulso de glucose. Este polinómio foi utilizado no modelo global para o cálculo do pH intracelular a partir dos valores calculados no modelo da variação de pH extracelular após adição de um pulso de glucose.

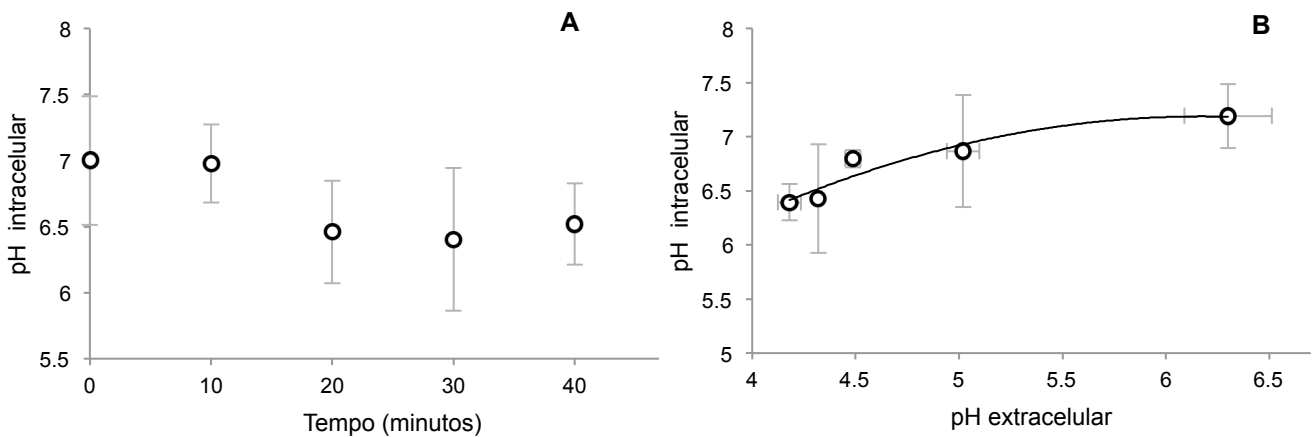


Figura 27: A - Valores médios de pH intracelular em função do tempo (○). B- Valores médios de pH intracelular em função do pH extracelular (○) e desvio padrão, bem como o ajuste efectuado aos dados (—).

Equação 45: $pH_{in} = -0.115216pH_{out}^2 + 1.56229pH_{out} + 1.93326$

Pela análise da Figura 27 pode verificar-se que o pH intracelular decresce ao longo do tempo, após um pulso de glucose seguindo a descida do pH extracelular.

A partir dos dados de pH extracelular obtidos após a adição do pulso de glucose (Figura 17), foi determinada a variação do pH intracelular correspondente a partir da Equação 45 (Figura 28-A).

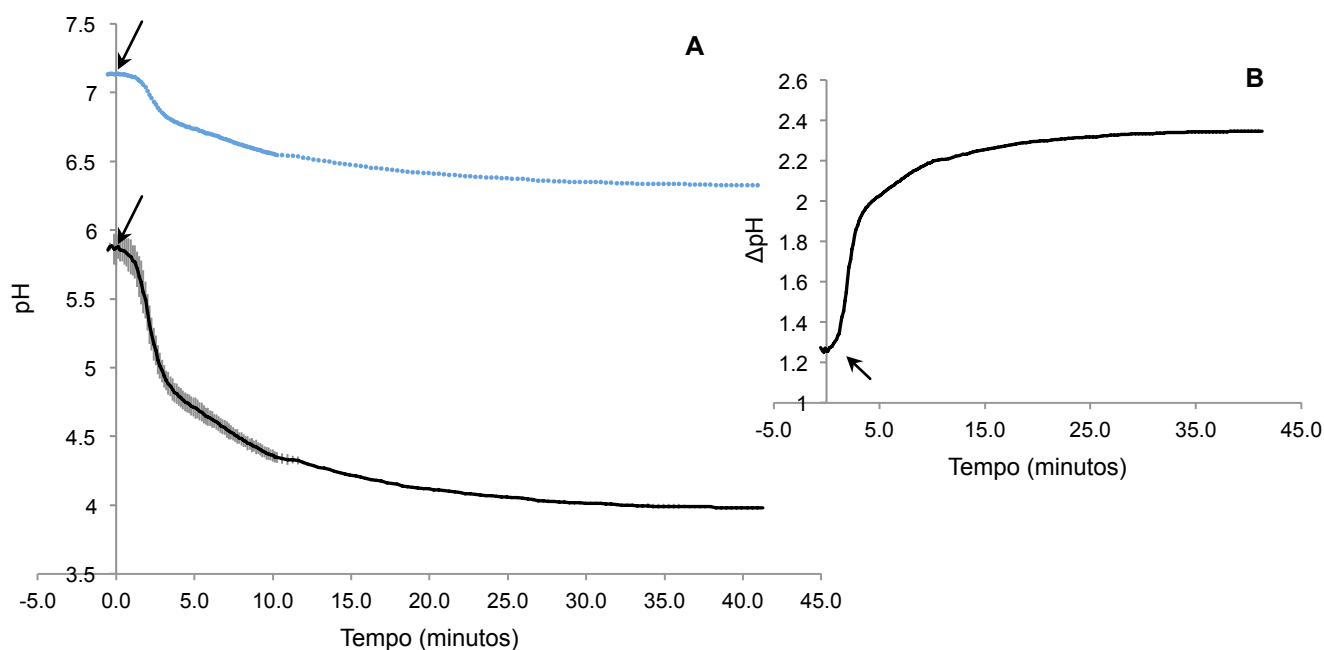


Figura 28: A - Variação do pH intracelular ao longo do ensaio (-----), determinado a partir do pH extracelular (—) e da Equação 45. B- Diferença entre pH intra e extracelular. A seta indica o momento em que foi adicionada a glucose.

6. Variação da concentração de K^+ extracelular após adição de um pulso de glucose

A concentração extracelular de potássio foi determinada utilizando um eléctrodo sensível a potássio, tendo sido efectuada uma calibração pela adição no final de cada ensaio de quantidades conhecidas Cloreto de Potássio (KCl), como descrito no ponto II-0

Quando se realizam estes ensaios é necessário calibrar os sinais obtidos. Verificou-se que nos ensaios após adição de um pulso de glucose a concentração extracelular de potássio diminuía e voltava a aumentar, atingindo aproximadamente o seu valor inicial, como se pode observar na Figura 29-A. Assim, optou-se por realizar duas abordagens distintas para a calibração do sinal: uma em que se adicionou uma quantidade conhecida de KCl após o final do ensaio (Figura 29-A) e outra em interrompendo o ensaio quando a concentração extracelular atingia o seu mínimo, adicionando então quantidades conhecidas de KCl (Figura 29-C). Na primeira situação foi possível adicionar uma única vez a solução de KCl, visto o sinal se encontrar já muito próximo do seu valor inicial (Figura 29-A). Desta forma, assumiu-se uma relação linear para a calibração por este método. Na segunda situação optou-se por adicionar KCl após o mínimo de concentração extracelular observado, obtendo-se uma calibração mais completa, Figura 29-C. Através da análise dos dados obtidos pela adição dos pulsos de KCl, apresentados na Figura 29-B, verifica-se que a relação entre o sinal e a concentração extracelular não é linear. Foi então realizado um ajuste aos dados desta calibração (apresentados na

Figura 29-B) de forma a poder ser determinada a quantidade extracelular de K^+ em cada ponto do ensaio (Equação 46).

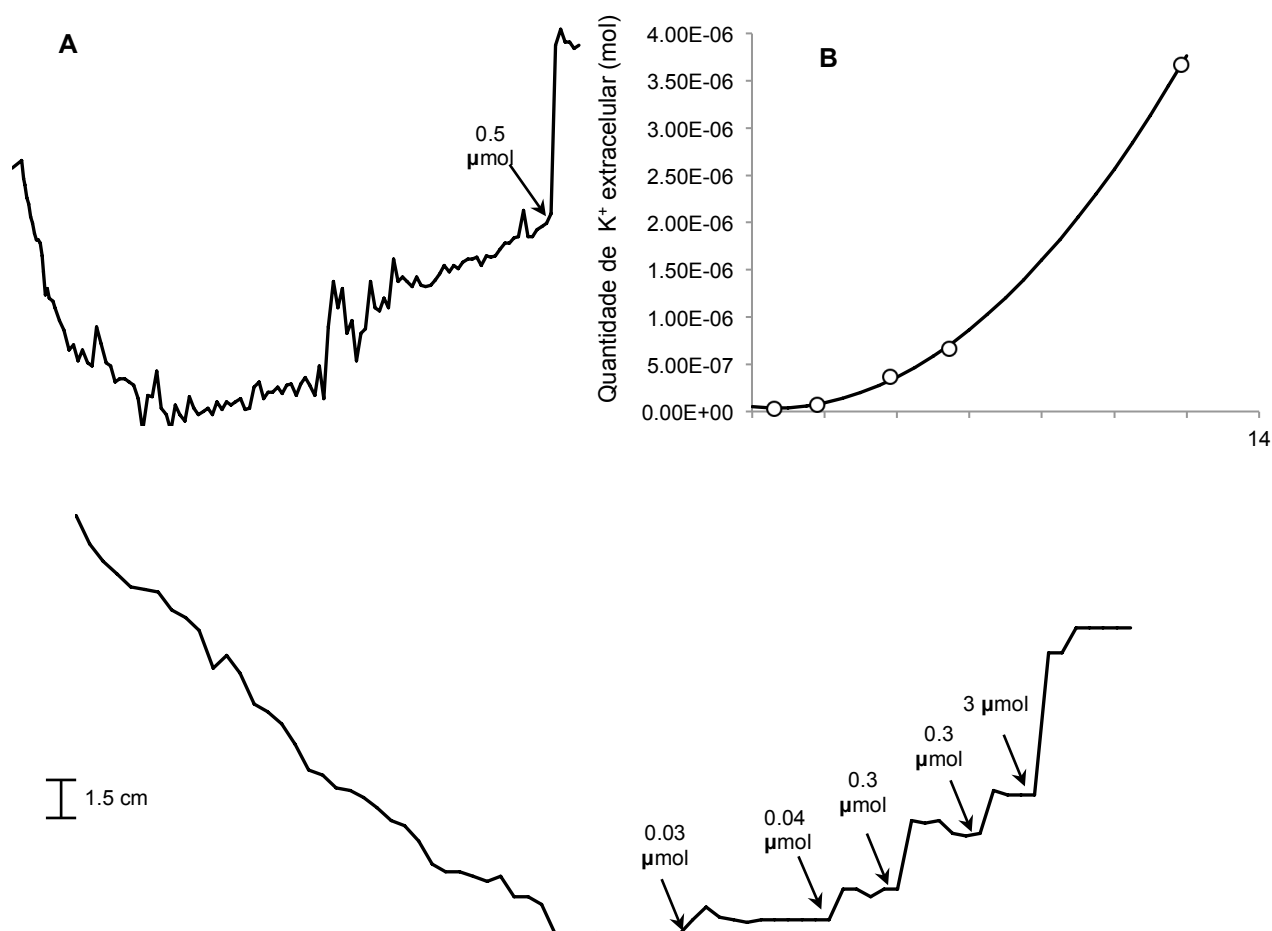


Figura 29: Calibração do sinal de potássio extracelular por adição de volumes de uma solução de KCl de concentração conhecida ao fim de 40 minutos (A) e no mínimo de concentração extracelular (C). As setas representam o momento da adição da solução e a quantidade de K^+ adicionada encontra-se indicada. B- Pontos experimentais relativos aos dados apresentados em C (O), com um ajuste polinomial (—). Estes dados foram obtidos para uma sensibilidade de 0.1 e uma velocidade de papel de $3 \text{ cm} \cdot \text{min}^{-1}$.

$$\text{Equação 46: } QK^+ = 2.88994 \times 10^{-8} \times \text{Distância}^2 - 3.71329 \times 10^{-8} \times \text{Distância} + 4.89455 \times 10^{-8}$$

A calibração da segunda situação serviria para calibrar os dados dos outros ensaios, uma vez que a caneta do registador não foi movida nem foi alterada a sensibilidade do aparelho. No entanto, o valor mínimo em que se iniciou esta calibração mostrou ser muito mais baixo que o mínimo observado para os outros ensaios o que se pode dever, por exemplo, a uma diferença de concentração de células nos ensaios ou ao facto de estas terem perdido mais K^+ para o meio extracelular antes do início do ensaio. Assim, optou-se por utilizar esta calibração e o respectivo ajuste para calibrar o mínimo de K^+ extracelular observado nos ensaios. Para a calibração dos outros pontos das curvas, acima do mínimo, foi utilizada a relação linear descrita na primeira situação.

Após a calibração foi determinado um valor médio para as duas curvas (os dois ensaios em separado encontram-se representados em Anexo). Os dois ensaios possuem um traçado muito

semelhante, no entanto o valor mínimo de concentração é maior no segundo ensaio, o que faz com que a curva esteja toda um pouco acima da curva do primeiro ensaio. Esta diferença é pouco perceptível no papel, dado que se trata de cerca de 2 cm de diferença mas, dado que a calibração não é linear e o mínimo destas curvas se encontra na região dos 6 a 8 cm da calibração que, como se pode observar na Figura 29-B, é a região em que se observa maior variação na quantidade de K^+ extracelular. Para efeitos de ajuste optou-se, como já foi referido, por utilizar um valor médio dos dois ensaios, apresentado na Figura 30. Os dados experimentais possuem alguma flutuação devido à sensibilidade e interferências com o próprio eléctrodo utilizado, pelo que foi ajustada uma curva aos dados experimentais (Figura 30-A), cujo comportamento é descrito pela Equação 47.

Equação 47: $[K^+] = -1.3379 \times 10^{-15} \times \text{Tempo}^5 + 1.5859 \times 10^{-13} \times \text{Tempo}^4 - 7.2585 \times 10^{-12} \times \text{Tempo}^3 + 1.5886 \times 10^{-10} \times \text{Tempo}^2 - 1.4982 \times 10^{-9} \times \text{Tempo} + 8.4962 \times 10^{-8}$

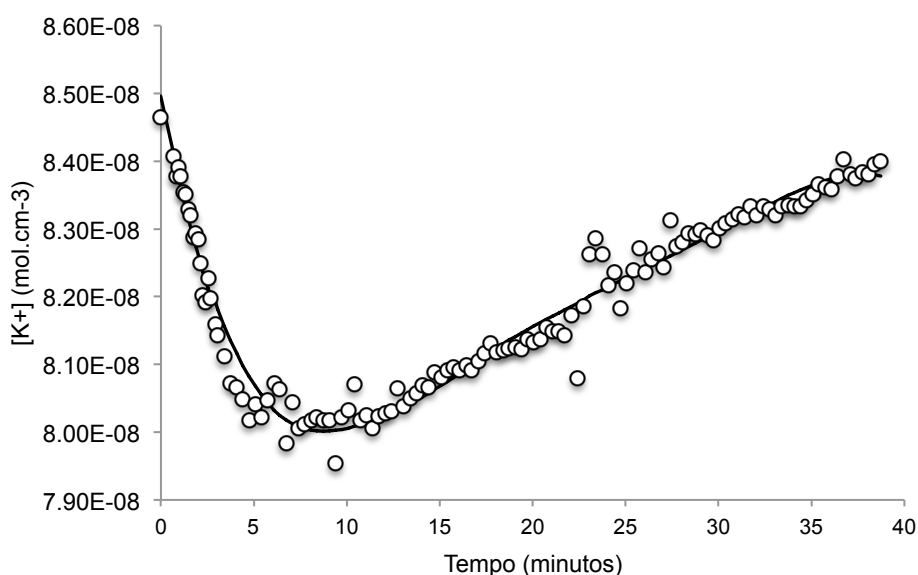


Figura 30: Dados relativos ao valor médio dos dois ensaios obtidos para a concentração extracelular de K^+ (O) e ajuste aos dados (—). Estes dados foram obtidos para uma sensibilidade de 0.1 e uma velocidade de papel de 3 cm.min⁻¹.

A partir deste valor médio e do ajuste foi determinada a quantidade de K^+ importado e a concentração intracelular, ambas na Figura 31. A quantidade de moles importadas para o meio intracelular (Figura 31-A) foi determinada directamente através da diminuição da concentração extracelular de K^+ . Uma vez que esta importação e a sua taxa vão depender da quantidade de células no ensaio, estes dados foram normalizados para o valor de peso seco do ensaio, em mg. A concentração intracelular de K^+ (Figura 31-B) foi determinada admitindo uma concentração intracelular inicial de 200 mM (Prista et al., 1997) e tendo em conta, não só o volume intracelular e o peso seco do ensaio.

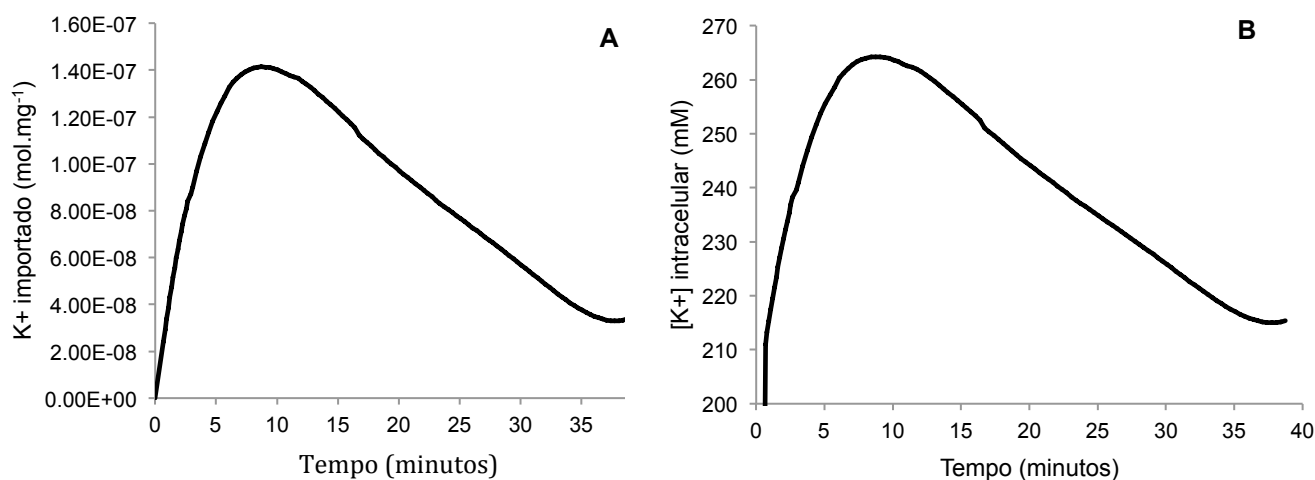


Figura 31: A- Representação da quantidade de K⁺ importado para o meio intracelular em número de moles por cada mg de peso seco. B- Variação da concentração intracelular de K⁺, tendo em conta uma concentração inicial de 200 mM.

7. Potencial de membrana (V_m), E_H e E_K

Como já foi referido no ponto II-3, fez-se um ensaio com TPP⁺ de forma a poder determinar-se o potencial de membrana. A Figura 32 mostra os resultados obtidos até alguns instantes após a adição da glucose, altura em que os registos deixaram de poder ser utilizados. Verificou-se uma subida contínua, ao contrário do esperado. Esperar-se-ia que, com a adição do pulso de glucose, se observasse um decréscimo do sinal, correspondente a uma diluição do TPP⁺ extracelular. De seguida seria expectável que o sinal subisse ou descesse, nunca ultrapassando o máximo correspondente à linha de estabilização do sinal antes da adição de glucose. No entanto, verificou-se em todos os ensaios e após a adição de glucose que o sinal subia imediatamente, ultrapassando em muito o máximo possível.

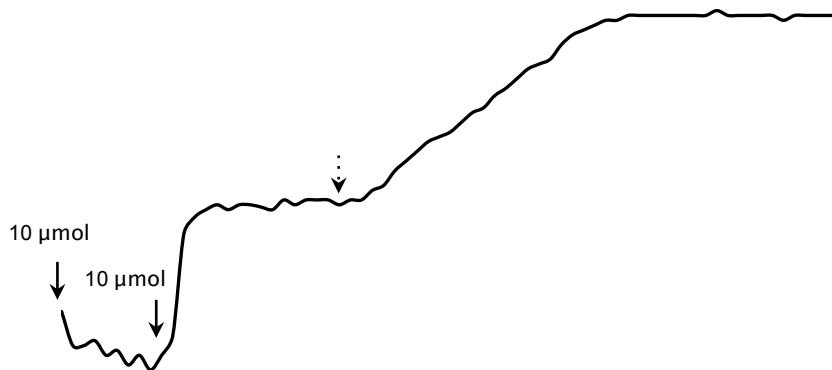


Figura 32: Ensaio de variação de TPP⁺ extracelular após adição de um pulso de glucose. As setas a cheio indicam o momento da adição de TPP⁺ enquanto que a seta a tracejado indica o momento de adição de glucose.

Assim, após a adição de glucose à suspensão celular, o sinal correspondente a um aumento na concentração extracelular de TPP^+ aumentou exageradamente (dados não apresentados), atingindo valores superiores aos observados para a concentração inicial adicionada à suspensão (3 μM). Dado que estas células não possuem capacidade de produzir este ião, o aumento do sinal deveria corresponder, não a um aumento de concentração extracelular, mas sim a algum tipo de interferência directa com o eléctrodo. Dados de medição do potencial de membrana foram anteriormente obtidos com esta mesma técnica mas realizadas em soluções tampão com pH extracelular controlado (Loureiro-Dias, comunicação pessoal). Assim e para testar se o factor de interferência seria a variação de pH observada após adição de pulso de glucose em suspensões em água (pH extracelular variável), foram então realizados os mesmos ensaios com as células ressuspendidas em solução tampão citrato fosfato a pH 4, 5 e 6 (preparadas de acordo com (Gomori, 1955), composição apresentada em Anexo) tendo sido obtidos sinais semelhantes aos descritos para as células ressuspendidas em água. Uma vez que foram testadas as soluções tampão, água, células e solução de glucose em separado e não se observou a variação de sinal, pensa-se que a interferência possa resultar de algum metabolito exportado pelas células e a que o eléctrodo seja sensível. Não foi, no entanto, possível em tempo útil obter dados suficientes para tirar qualquer tipo de conclusão nem para excluir qualquer das hipóteses, tendo sido utilizada outra abordagem para a determinação do potencial de membrana (V_m).

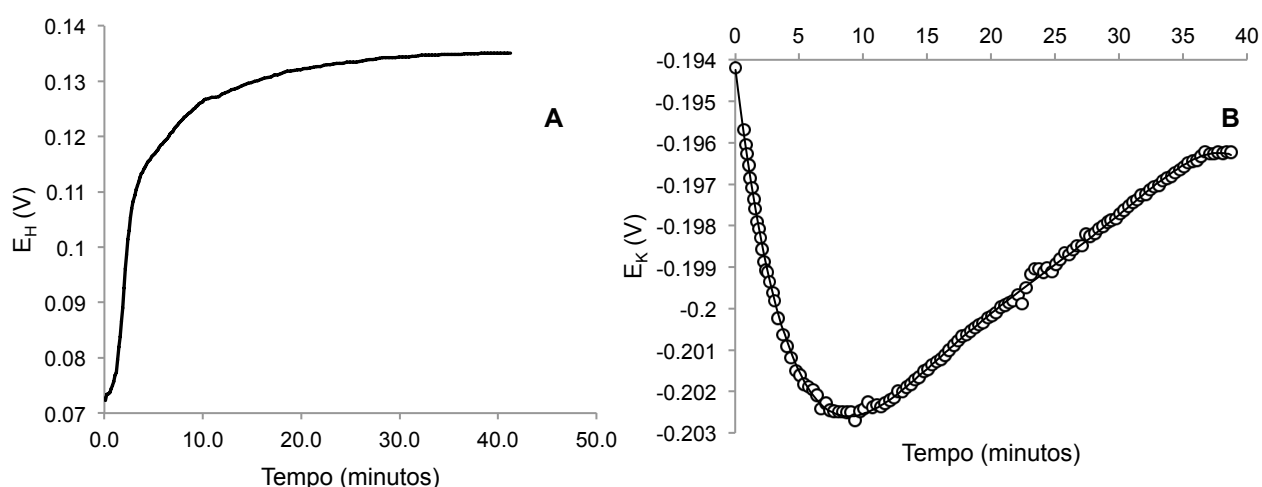


Figura 33: Potencial de equilíbrio do protão (A) e do ião potássio (B), determinados a partir dos dados experimentais. Em B encontram-se representados os dados experimentais (O) e o respectivo ajuste (—).

O V_m é função dos potenciais de equilíbrio E_H e E_K , ponderados pela sua respectiva condutância relativa (g_H e g_K) e pela contribuição dos outros sistemas de transporte (electrogeneidade) (Equação 16).

O potencial de equilíbrio dos dois iões pode ser determinado utilizando a Equação 5. O potencial de equilíbrio do protão pode ser determinado directamente através dos dados (nos pontos III-4 e 5.2, apresentados na Figura 33-A). O modelo global ajusta a concentração extracelular de protões, consequentemente o pH extracelular, e determina de acordo com a

Equação 45 o pH intracelular e a variação de E_H . No caso do ião K^+ , uma vez que a concentração deste não irá ser ajustada no modelo, optou-se por calcular directamente o potencial de equilíbrio deste ião pela Equação 5 e efectuar um ajuste que simule o comportamento desta curva (Figura 33-B), que possa ser inserido no modelo global para o cálculo do V_m .

Equação 48: $E_K = -3.1035 \times 10^{-18} \times \text{Tempo}^5 + 2.1821 \times 10^{-14} \times \text{Tempo}^4 - 5.9062 \times 10^{-11} \times \text{Tempo}^3 + 7.6383 \times 10^{-8} \times \text{Tempo}^2 - 4.2747 \times 10^{-5} \times \text{Tempo} - 0.1938$

8. Permeabilidade da membrana ao protão, Perm_H

De forma a estimar a permeabilidade difusional do ião H^+ foram utilizados dados experimentais de variação de pH extracelular em função do tempo, de uma suspensão celular antes da adição de um pulso de glucose. Os dados apresentados na Figura 34-A mostram um aumento contínuo do pH extracelular com o tempo. Após a conversão do pH em unidades de concentração extracelulares de H^+ obtiveram-se os resultados experimentais apresentados na Figura 34-B que, através de um ajuste numérico, utilizando a Equação 18, permitem estimar a permeabilidade difusional da membrana ao protão, Perm_H .

Para este ajuste foi necessário saber o valor do potencial de membrana, que se considera determinado pelos valores dos potenciais de equilíbrio E_H e E_K . este último foi determinado pela Equação 48, sabendo o pH extracelular e calculando o pH intracelular. Para o valor de E_K foi necessário assumir uma concentração intracelular inicial de K^+ de 200 mM (Prista et al., 1997), tal como no ponto III-6.

Através das equações descritas foi efectuado um ajuste às três curvas experimentais e obtido um valor de Perm_H de $1 \times 10^{-4} \text{ cm.s}^{-1}$, sendo este valor utilizado como valor inicial no modelo global.

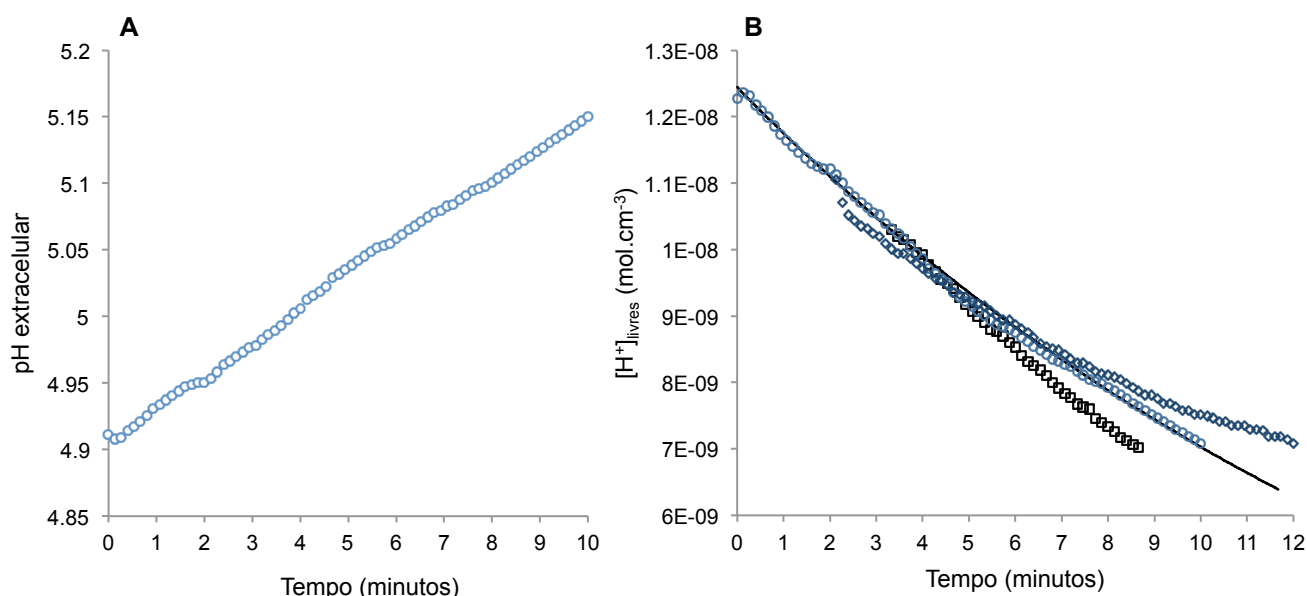


Figura 34: A - Variação do pH extracelular antes da adição de glucose (apenas é apresentada uma das curvas obtidas). B- Ajuste (—), através da equação de fluxo de Goldman, à Variação da concentração extracelular de protões livres; estão representadas as três curvas experimentais obtidas. Estes dados foram obtidos com uma sensibilidade de 0.5 e uma velocidade de papel de 3 cm.min^{-1} .

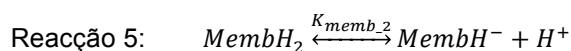
9. Modelo global

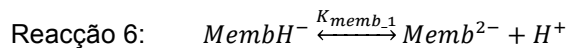
As simulações numéricas para o modelo matemático global descrito na introdução, permitiram estimar o valor otimizado de todos os parâmetros cinéticos dos sistemas de transporte e das constantes de metabolismo consideradas. Partiu-se de valores de área total da membrana plasmática (A_{total}), volume total interno (V_{in}) e externo (V_{out}), parâmetros estimados da entrada de glucose (V_M^{Glu} , K_M^{Glu}), entrada de prótons ($Perm_H$, antes da adição do pulso de glucose) e dos obtidos pela curva de titulação da membrana ($Memb_T$, MH_0 , pK_{memb_1}). Para o modelo global foram utilizados os valores das concentrações extracelulares de prótons livres, ligados e totais no meio extracelular, determinados a partir dos dados experimentais de pH extracelular (Ponto III-4).

Considerou-se que a constante k_{fosf} teria o valor de 1 s^{-1} , suficientemente elevado para que toda a glucose que entrasse fosse imediatamente fosforilada, mantendo a sua concentração intracelular baixa. Os parâmetros cinéticos da H^+ -ATPase (V_M^{Bomba} , K_M^{ATP}) e da k_{gli} foram estimados a partir de um ajuste aos dados experimentais das concentrações de prótons livres, ligados e totais no meio extracelular enquanto que o valor de $K_M^{H^+}$, também relativo à H^+ -ATPase, foi assumido como sendo um valor muito baixo ($2.39 \times 10^{-13}\text{ mol.cm}^{-3}$) de modo a não constituir um factor limitante na capacidade de exportação de prótons da bomba. Partiu-se da concentração inicial de glucose extracelular estimada ($1.34 \times 10^{-5}\text{ mol.cm}^{-3}$) considerando-se a concentração inicial dos outros solutos igual a 0, uma vez que as células foram mantidas uma hora em água desmineralizada.

9.1. Modelo geral

Não fazendo mais nenhuma restrição ao modelo, verificou-se que as curvas teóricas obtidas após optimização dos parâmetros não conseguiam simular o comportamento dos dados experimentais (Figura 35-A). Verificou-se que para obter uma variação de concentração de H_{livre}^+ (curva c) que se sobrepujasse aos dados experimentais (só conseguida ao fim 10 minutos) as curvas de concentração de H_{total}^+ (curva a) e H_{ligado}^+ (curva b) não seguiam o perfil dos dados experimentais, descolando quer no início para valores mais baixos, quer no final para valores mais elevados. Para que as curvas a e b pudessem sobrepor-se nos 5 minutos iniciais (onde se dá quase toda a protonação da membrana ponderou-se a existência de dois graus de protonação na membrana, com valores de pK próximos. Utilizando os mesmos dados experimentais do ponto III-4.1 foi realizado um novo ajuste (Figura 35-C) e determinados os novos parâmetros da membrana (Nesta segunda calibração da membrana foram obtidos valores idênticos de MH_0 e M_T e os valores de pK que constam da tabela, 6.66 e 5.945). Assim, em lugar de um só pK, 6.38, considerou-se a existência destas duas constantes de protonação no modelo global, que foram optimizados no ajuste aos dados experimentais sendo que pK_{memb_2} possui um valor de 5.5 (Figura 35-B) (Tabela 15), de acordo com as equações reescritas para dois graus de protonação:





Equação 49: $K_{memb_1} = \frac{[Memb^{2-}].[H^+]_{out}}{[MembH^-]}$

Equação 50: $K_{memb_2} = \frac{[MembH^-].[H^+]_{out}}{[MembH_2]}$

Equação 51: $[M_T] = [MembH_2] + [MembH^-] + [Memb^{2-}]$

Desta forma, também a equação que define o número de prótons ligados deve ser redefinida:

Equação 52: $[H^+]_{ligado} = 2.[MembH_2] + [MembH^-]$

Equação 53: $[MembH^-] = \frac{[M_T]}{\frac{[H^+]_{out}}{K_{memb_2}} + \frac{K_{memb_2}}{[H^+]_{out}} + 1}$

Equação 54: $[MembH_2] = \frac{[MembH^-].[H^+]_{out}}{K_{memb_2}}$

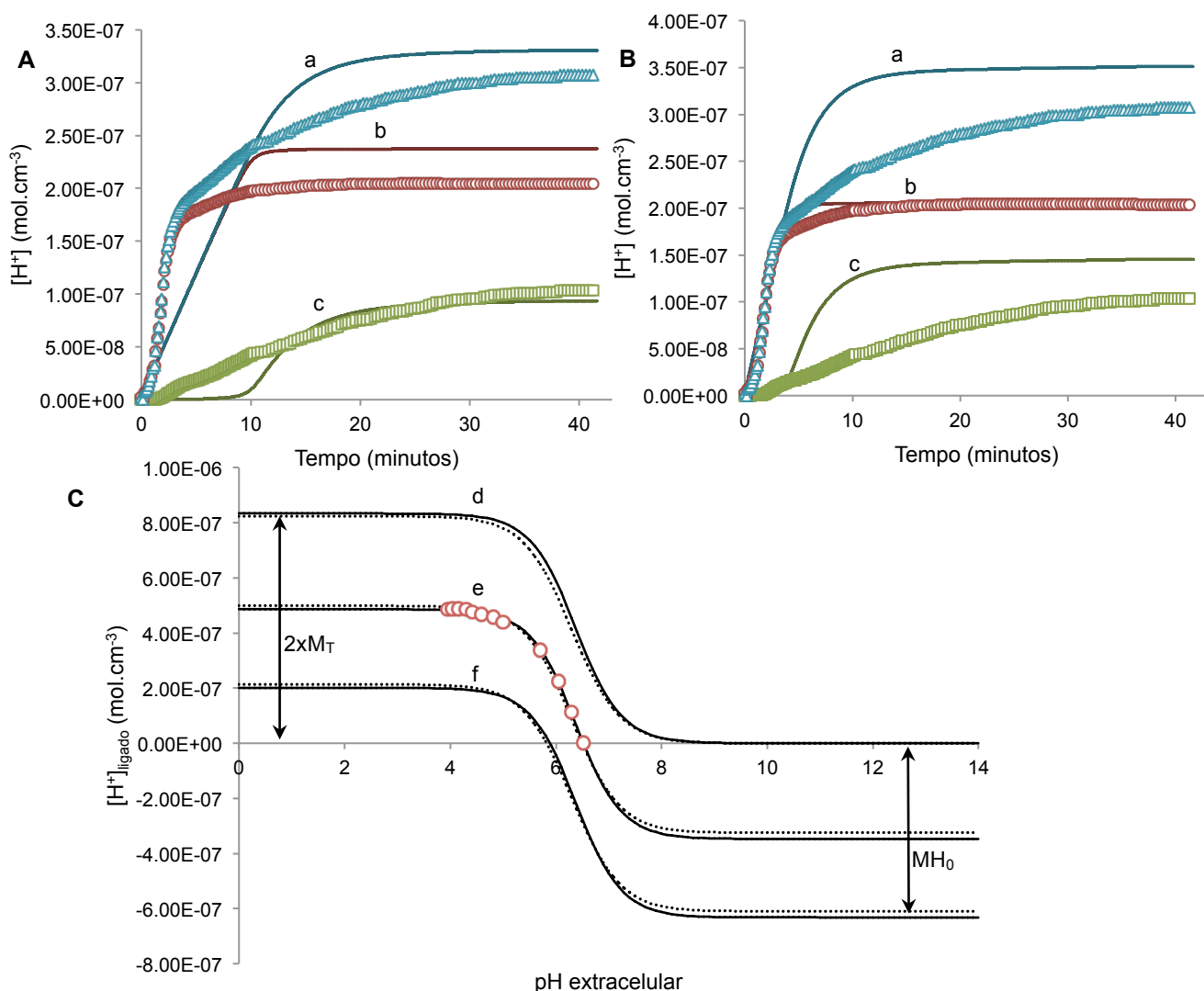


Figura 35: Dados experimentais de concentração de prótons ($[H^+]_{totais}$ - Δ ; $[H^+]_{ligados}$ - \circ ; $[H^+]_{livres}$ - \square) e simulações destas concentrações (a - $[H^+]_{totais}$; b - $[H^+]_{ligados}$; c - $[H^+]_{livres}$); representadas por linhas) utilizando um grau de protonação (A), com um pK_{memb} de 6.38, e dois graus de protonação (B), com pK_{memb_1} e pK_{memb_2} de 6.5 e 5.945, respectivamente. C – Ajuste aos dados experimentais simulando um grau de protonação (curvas a cheio) e dois graus de protonação (curvas a tracejado). d) Simulação da curva de titulação da membrana com início a pH 14 (—). e) Curva de titulação ajustada (ajuste representado por —) aos dados experimentais (\circ) apresentados na Figura 19. f) Simulação (—) da curva de titulação com os dados experimentais (\diamond) tratados de forma a começar no pH de início dos ensaios de pH extracelular (pH 5.8).

Nesta segunda calibração da membrana foram obtidos valores idênticos de MH_0 e M_T e os valores de pK que constam da tabela, 6.66 e 5.945. Assim, em lugar de um só pK , 6.38, considerou-se a existência destas duas constantes de protonação no modelo global, que foram otimizados no ajuste aos dados experimentais sendo que pK_{memb_2} possui um valor de 5.5 (Figura 35-B).

Tabela 15: Parâmetros determinados através dos ajustes à concentração de prótons ligados à membrana, para dois graus de protonação.

pK_{memb_1}	pK_{memb_2}	MH_0 (mol.cm ⁻³)	M_T (mol.cm ⁻³)
6.66	5.945	6.13×10^{-7}	3.66×10^{-6}

9.2. Inibição da bomba por híper ou depolarização da membrana

Observando melhor o comportamento das curvas experimentais (Figura 35- B), verifica-se que a partir dos 3-4 minutos há uma alteração do declive das curvas sugerindo que há uma diminuição do número de prótons transportados pela bomba. Para simular esta situação considerou-se que, a partir dos 3 minutos, a bomba sofria uma inibição instantânea de cerca de 75-85%. A Figura 36-A mostra estes resultados onde se verifica que, apesar da curva *b* ter um muito bom ajuste, as outras duas *a* e *c* descolam a partir dos 12 minutos, sugerindo que a exportação de prótons está deficitária relativamente aos dados experimentais. Esta situação indica que a bomba deve recuperar, pelo menos parcialmente da inibição a que foi sujeita após os 3 minutos iniciais. Na Figura 36-B mostra-se a simulação obtida quando se considerou uma recuperação da inibição para 20-30%, isto é, a bomba estaria a funcionar a cerca de 70-80% a partir dos 12 minutos e até ao final do ensaio. Esta inibição poderia ser o resultado de uma possível hiperpolarização da membrana. Assim, decidiu-se observar a variação do potencial de membrana em duas condições distintas, considerando em ambas a contribuição em -10 mV da electrogeneidade de outros sistemas de transporte:

a) E_K determina o perfil de V_m – Hiperpolarização da membrana ao longo do ensaio

Na primeira situação, o valor de potencial de membrana é determinado fundamentalmente pela contribuição do E_K ($g_K = 0.995$), desprezando a contribuição do E_H . Neste caso verifica-se que ao longo da simulação o V_m se vai tornando cada vez mais negativo, seguindo o perfil do E_K que por sua vez é determinado pelos fluxos de K^+ medidos (Figura 30 e Figura 33-B).

b) E_K e E_H determina o perfil de V_m - Depolarização da membrana ao longo do ensaio

No segundo caso considera-se que a contribuição do E_K para o valor de V_m ainda é maioritária ($g_K = 0.75$) mas não totalmente determinante do perfil do potencial, que possui também a contribuição do E_H . Este vai variando ao longo do tempo devido à alteração das concentrações intra e extracelulares de próton provenientes da entrada difusional (Equação 18) e saída pela bomba (Equação 19).

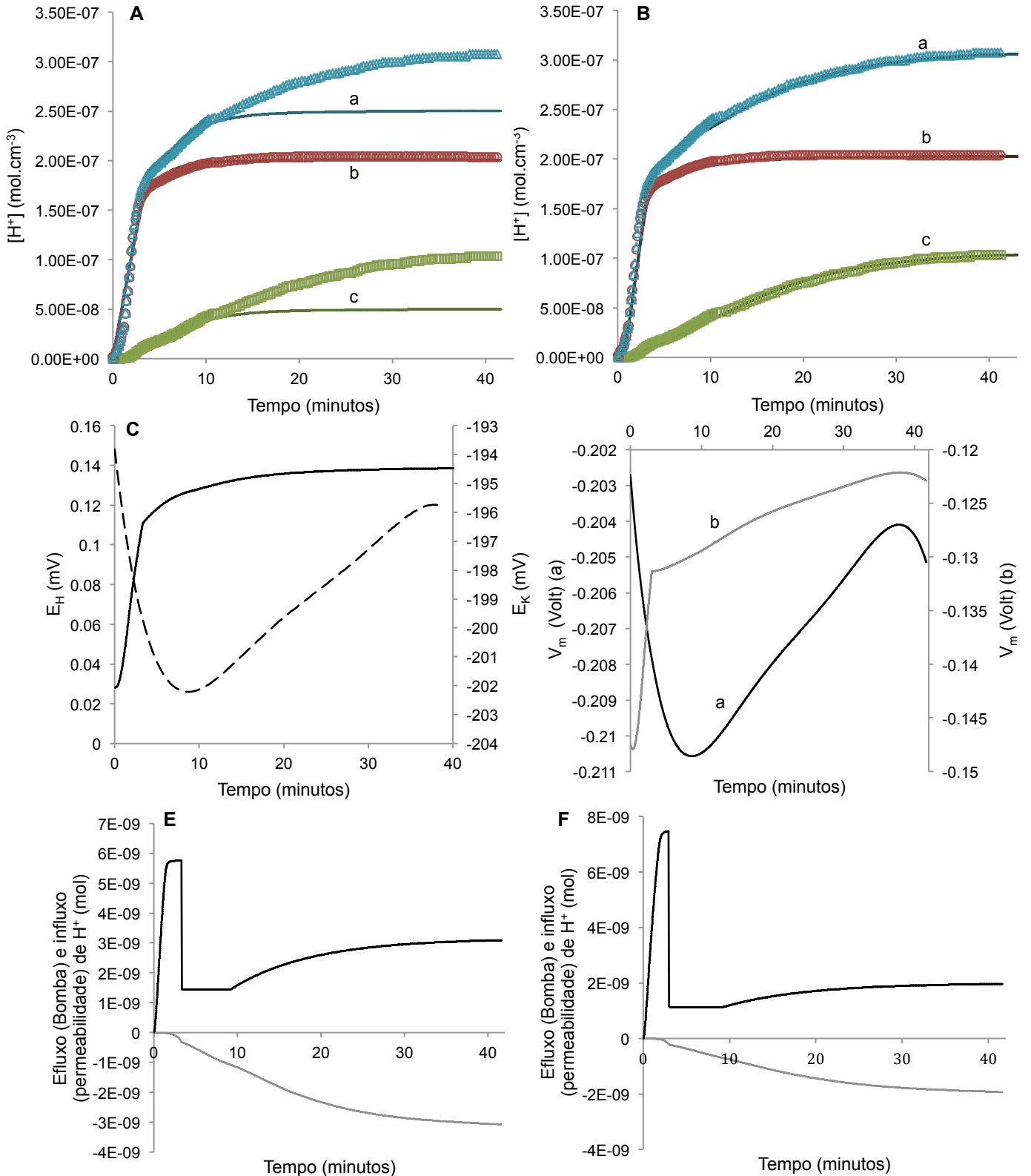


Figura 36: Dados experimentais de concentração de prótons ($[H^+]_{\text{totais}}$ - Δ ; $[H^+]_{\text{ligados}}$ - \circ ; $[H^+]_{\text{livres}}$ - \square) e simulações destas concentrações (a - $[H^+]_{\text{totais}}$; b - $[H^+]_{\text{ligados}}$; c - $[H^+]_{\text{livres}}$); representadas por linhas), com um grau de inibição (A) e dois tipos de inibição da bomba (B). B- Potencial de equilíbrio do próton (E_H) calculado no modelo (—) e potencial de equilíbrio do potássio (---). D- Potenciais de membrana para a situação a) (—) e b) (---). Nos painéis E e F encontram-se representados, para as situações a) e b) respectivamente, o efluxo de prótons pela bomba (—) e o influxo de prótons por permeabilidade (---).

Na Figura 36-C a F encontram-se os resultados destas simulações. No painel B mostram-se as curvas simuladas e experimentais obtidas para a situação *a*), em que V_m é determinado por E_K , não se mostrando as mesmas curvas para a situação *b*), em que V_m depende quer de E_K como de E_H , por estas possuírem um traçado idêntico. Verifica-se que em ambos os casos as três curvas simuladas se sobrepõem às experimentais. No painel C são apresentadas as variações dos potenciais de equilíbrio do protão e do potássio ao longo do tempo e no D a variação do potencial de membrana, para ambas as situações para a situações *a*) e *b*). Nos painéis E e F apresentam-se os fluxos de entrada (difusional, fluxos negativos) e saída (bomba, fluxos positivos) de protões, para ambas as situações, onde se pode verificar que os fluxos de saída têm em valor absoluto, um valor superior aos de entrada, o que justifica o aumento da concentração total de protões exportados e consequente diminuição do pH extracelular medido.

Analisando e comparando a variação do potencial na Figura 36-D, verifica-se que há uma hiperpolarização da membrana nos primeiros 10 minutos para a situação em que o V_m é determinado por E_K (*a*), enquanto que em *b*) há uma acelerada despolarização (valores menos negativos) da membrana nos primeiros 3 minutos, desacelerando depois devido à inibição da bomba. Assim, não foi possível demonstrar que a causa da inibição observada da bomba era devida a um hiperpolarização da membrana, conforme é verificado noutros sistemas (Loureiro-Dias, comunicação pessoal). Para cada situação os valores estimados dos parâmetros encontram-se na Tabela 16.

Tabela 16: Parâmetros estimados no modelo global para as situações *a*) e *b*).

Parâmetros	Unidades	Situação <i>a</i>)	Situação <i>b</i>)
Peso seco	mg.mL ⁻¹	0.196	
MH ₀	mol.cm ⁻³	3.21x10 ⁻⁶	
M _{T_init}	mol.cm ⁻³	1.38x10 ⁻⁶	
k _{fosf}	s ⁻¹	1	1
K _{gli}	s ⁻¹	5.8x10 ⁻³	5.8x10 ⁻³
g _K	adimensional	0.995	0.750
V _{M^{Bomba}}	mol.cm ⁻³ .s ⁻¹	2.68x10 ⁻⁵	3.58x10 ⁻⁴
K _{M^{ATP}}	mol.cm ⁻³	7.96x10 ⁻⁷	
K _{M^{H⁺}}	mol.cm ⁻³	2.39x10 ⁻¹³	
Perm _H	cm.s ⁻¹	1x10 ⁻³	

9.3. ATP formado e quantidade total de protões exportados

A quantidade total de moles de glucose correspondentes ao pulso de glucose de 11 mM e consumida pelas células foi de 55x10⁻⁶ moles, o que corresponde à formação de 110x10⁻⁶ moles de ATP, que ficam disponíveis para as células utilizarem no transporte activo de bombeamento dos

protões pela H^+ -ATPase. Considerando uma estequiometria de $1ATP:1H^+$ (Ambesi et al., 2000), as células teriam a capacidade de exportar um máximo de 110×10^{-6} protões para o seu meio extracelular. A partir dos dados experimentais, no entanto, verifica-se que houve um acréscimo (no meio extracelular) de 1.5×10^{-6} protões totais (livres + ligados), correspondentes apenas a 1.36% do total possível se todo o ATP produzido fosse consumido pela bomba. Assim, ou a maior parte do ATP produzido é utilizado pelas células noutros processos de manutenção celular ou, no caso deste ATP ser maioritariamente utilizado pela bomba, as células teriam de re-circular os protões de modo a consumirem todo o APT produzido. Caso esse ATP não fosse consumido em nenhum processo e se acumulasse nas células a sua concentração intracelular atingiria valores da ordem dos 500 M, tendo em conta o volume total interno de $1.98 \times 10^{-4} \text{ cm}^3$ (Ponto III-2), valor absolutamente impossível.

Nas simulações do modelo global aqui apresentado, considerou-se que o acréscimo dos protões medidos no meio extracelular ($H_{total}^+ = H_{livre}^+ + H_{ligado}^+$) provinha integralmente da diferença entre a quantidade de protões que saíram pela bomba e que entraram por difusão, e que a operação da bomba só daria conta destes resultados. Assim se só 1.36% do ATP formado for consumido pela bomba neste processo, as concentrações intracelulares de metabolitos calculadas pelo modelo (glucose, G6P e ATP) deverão estar muito elevadas, visto o modelo não estar a considerar quaisquer outros processos para o consumo do ATP, nem a considerar a hipótese de haver uma re-circulação de próton capaz de justificar os resultados experimentais.

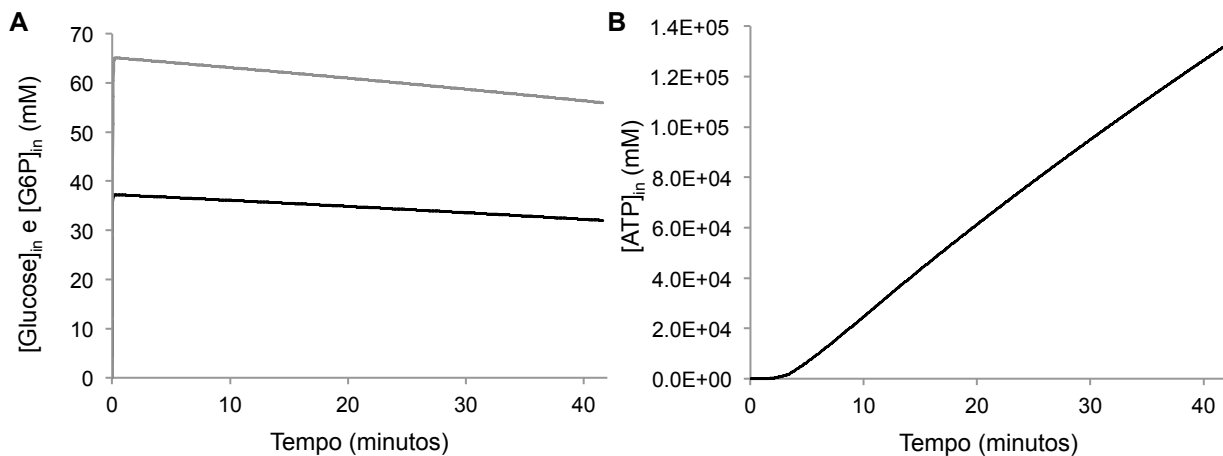


Figura 37: Concentrações intracelulares de (A) glucose (—), G6P (---) e (B) ATP.

Na Figura 37 encontra-se apresentada a simulação da variação temporal das concentrações intracelulares de glucose, G6P e ATP. Verifica-se que Glucose e G6P atingem valores elevados de concentrações de 35 e 70 mM respectivamente. Relativamente ao ATP o modelo calcula uma acumulação excessiva, chegando a valores $> 100 \text{ M}$. Do ponto de vista da simulação estes valores são previsíveis de acordo com os argumentos já apresentados.

IV. CONCLUSÕES

Ao longo deste trabalho foram utilizadas diversas técnicas experimentais que permitiram obter o conjunto final de dados utilizado para a modelação matemática e simulação numérica do comportamento da levedura *S. cerevisiae* em suspensão não tamponizada, quando sujeita a pulsos de glucose. As técnicas utilizadas são de campos distintos: espectroscopia de UV-Visível, utilizada para o doseamento da concentração de glucose extracelular; radioactividade de ^{14}C , utilizada para medição da variação do pH intracelular; microscopia de fluorescência, utilizada também para medição da variação do pH intracelular; potenciometria (eléctrodos de pH, K^+ e TPP^+), para medição das variações de pH extracelular e concentrações extracelulares de K^+ e TPP^+ . Esta última técnica compreendeu uma componente diferente, uma vez que, para a medição de K^+ e TPP^+ , foi necessário construir os eléctrodos de raiz, o que implicou recuperar uma técnica menos utilizada nos dias de hoje, recorrendo à literatura e a conhecimentos transmitidos por utilizadores anteriores.

Através dos dados experimentais obtidos foi possível monitorizar:

- O consumo de glucose extracelular, pelas células de *S. cerevisiae*;
- O decréscimo do pH extracelular após a adição do pulso de glucose;
- As propriedades ácido base da membrana celular (e parede) que “absorvem” parte dos prótons exportados para o meio extracelular;
- O decréscimo do pH intracelular que acompanha o decréscimo observado do pH extracelular após a adição de um pulso de glucose
- O aumento do pH intracelular que acompanha o aumento do pH extracelular verificado após consumo da glucose;
- O decréscimo na concentração extracelular de potássio após a adição de um pulso de glucose, atingindo um mínimo e voltando a aumentar até ao final dos ensaios;
- O aumento do pH extracelular, quando as células se encontram apenas em suspensão, sem qualquer adição de glucose, o que sugere que a membrana é permeável à entrada de prótons impulsionados pela sua força protomotriz.

Alguns metodologias experimentais não conduziram a resultados concretos e passíveis de conclusões quantitativas ou qualitativas (pH intracelular por microscopia de fluorescência e variação da concentração de TPP^+ extracelular). Contudo, o contacto com estas técnicas permitiu desenvolver aptidões e adquirir conhecimentos e podem, futuramente e após optimização dos respectivos protocolos experimentais, ser utilizadas noutras abordagens.

O modelo matemático desenvolvido permitiu utilizar todos os dados experimentais obtidos, quer tratando-os de uma forma individualizada de modo a estimar os respectivos parâmetros (glucose, fluxos difusionais de próton, propriedades ácido base da membrana, potencial de membrana), quer numa visão mais globalizante, onde todos os parâmetros estimados individualmente foram considerados no modelo global, permitindo depois estimar os parâmetros cinéticos do efluxo de prótons pela H^+ -ATPase.

Com este modelo foi assim possível analisar os dados separadamente e obter estimativas dos valores :

- Dos parâmetros de transporte de glucose, V_M^{Glu} , K_M^{Glu} , que se verificou serem idênticos aos descritos na literatura;
- Da permeabilidade da membrana aos prótons, $Perm_H$;
- Das propriedades ácido base da membrana (e parede) tendo-se estimado duas constantes de protonação, pK_{mem_1} e pK_{memb_2} , e os parâmetros MH_0 e M_T ;
- Da variação do potencial de membrana.

O modelo global permitiu correlacionar a variação temporal de todas as variáveis medidas (entrada de glucose e potássio, variações de pH extracelular antes e após adição do pulso de glucose e propriedade ácido base da membrana) dando uma visão geral dos vários processos de transporte trans-membranar e produção/consumo de ATP envolvidos em células de *S. cerevisiae*. Com este modelo foi possível:

1. Estimar os parâmetros cinéticos da H^+ -ATPase, V_M^{Bomba} , K_M^{ATP} e $K_M^{H^+}$ tendo exclusivamente em conta o acréscimo do número total de prótons no meio extracelular, verificados a partir das variações de pH externo e das propriedades ácido base da membrana.
 - a. Prever que nesta situação e de acordo com os resultados experimentais, a bomba sofre uma inibição quando o pH extracelular baixa para valores inferiores a 4.4, voltando no entanto a recuperar parcialmente a sua actividade.
 - b. Que a inibição da bomba não está necessariamente acoplada a processos de hiperpolarização da membrana.
 - c. Prever uma acumulação excessiva de ATP intracelular, a níveis não fisiológicos.
2. Prever que para que a concentração de ATP baixasse para níveis fisiologicamente viáveis e o pH extracelular se mantivesse aos níveis experimentais medidos, teria de haver uma recirculação de prótons entre os meios intra e extracelulares que garantisse que a bomba consumia grande parte do ATP formado. Essa recirculação implicaria que a bomba funcionasse a uma taxa máxima de 50-70 vezes superior à calculada.
3. Verificar que estas previsões do modelo estão de acordo com a razão calculada entre a quantidade total de prótons efectivamente adicionados ao meio extracelular e a quantidade total de ATP produzida (5.5×10^{-6} moles de ATP). Assumindo uma estequiometria de 1ATP:1 H^+ na operação da H^+ -ATPase esta razão equivale a que só 1.36% do ATP produzido seria utilizado para a exportação do número de prótons necessários para o abaixamento de pH observado, tendo em conta as propriedades ácido base da membrana e os fluxos de entrada observados.

O modelo global possui assim um carácter preditivo que permitiu, após análise cuidada de todos os resultados, parâmetros e simulações, prever a grande recirculação de prótons entre os meios intra e extracelulares durante o consumo do ATP proveniente do pulso de glucose. Em alternativa e para explicar o grande consumo de ATP, poderão ocorrer intra-celularmente outros processos que escapam à abordagem fisiológica convencional do metabolismo desta leveduras. Uma abordagem experimental acoplada a uma abordagem de modelação matemática e de

simulação numérica permite, assim, ter uma visão mais global dos processos intracelulares e de transporte das células de *S. cerevisiae*, levantando questões que não são usualmente exploradas.

De um ponto de vista da ecologia da levedura poderá parecer um contrassenso que as células consumam glucose rapidamente, produzindo ATP, numa situação em que não dispõem de outros nutrientes para crescer e em que aparentemente a necessidade de bombagem de prótons mobiliza uma quantidade de ATP muito inferior ao que será efectivamente produzido por fermentação. Mas poderemos encarar o consumo rápido da glucose como uma vantagem ecológica: numa situação natural em que a glucose é abundante, abundarão também outros microorganismos a competirem para a utilização desse substrato. A fermentação rápida que *S. cerevisiae* leva a cabo conduz à exaustão do substrato e simultaneamente à acumulação de um produto tóxico (o etanol) que inibe o crescimento dos competidores. E este processo é acompanhado de uma descida do pH do ambiente, o que dificulta mais a sobrevivência desses microorganismos. Eliminados os competidores, a levedura retém a capacidade de utilizar o etanol como fonte de carbono e energia, agora num processo respiratório aeróbio. Segundo este ponto de vista, faz sentido que a fermentação se realize, mesmo quando não haja necessidade de ATP numa perspectiva estritamente fisiológica.

V. BIBLIOGRAFIA

- AMBESI, A., MIRANDA, M., PETROV, V. V. & SLAYMAN, C. W. 2000. BIOGENESIS AND FUNCTION OF THE YEAST PLASMA-MEMBRANE H⁺ -ATPase. *Journal of Experimental Biology*, 160, 155-160.
- ASCHI, M., ARCHIVIO, A. A. D., FONTANA, A. & FORMIGLIO, A. 2008. Physicochemical Properties of Fluorescent Probes : Experimental and Computational Determination of the Overlapping pK a Values of Carboxyfluorescein. *Journal of Organic Chemistry*, 73, 3411-3417.
- BERG, J. M., TYMOCZKO, J. L. & STRYER, L. 2002. *Biochemistry*, New York, Company, W. H. Freeman and.
- BREEUWER, P. & ABEE, T. 2000. Assessment of the intracellular pH of immobilized and continuously perfused yeast cells employing fluorescence ratio imaging analysis. *Journal of microbiological methods*, 39, 253-64.
- BRO, C., REGENBERG, B., FÖRSTER, J. & NIELSEN, J. 2006. In silico aided metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for improved bioethanol production. *Metabolic engineering*, 8, 102-11.
- CARMELO, V., SANTOS, H. & SÁ-CORREIA, I. 1997. Effect of extracellular acidification on the activity of plasma membrane ATPase and on the cytosolic and vacuolar pH of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1325, 63-70.
- ELLEUCHE, S. & PO, S. 2010. Mini-Review Carbonic anhydrases in fungi. *Microbiology*, 23-29.
- ENGELMAN, D. M. 2005. Membranes are more mosaic than fluid. *Nature*, 438, 578-580.
- FORESTER, T. R., SMITH, W. & CLARKE, J. H. R. 1995. Capture of potassium ions by valinomycin: a molecular dynamics simulation study. *The Journal of Physical Chemistry*, 99, 14418-14423.
- GOMORI, G. 1955. Preparation of Buffers for Use in Enzyme Studies. *Methods in Enzymology*, 1, 138-146.
- GONÇALVES, T. & LOUREIRO-DIAS, M. C. 1994. Aspects of glucose uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of bacteriology*, 176, 1511-3.
- GRENSON, M. 1992. Amino Acid Transporters in Yeast : Structure, Function and Regulation. *Molecular Aspects of Transport Proteins*. Elsevier Science Publishers.
- KAMO, N., MURATSUGU, M., HONGO, R. & KOBATAKE, Y. 1979. Membrane potential of mitochondria measured with an electrode sensitive to tetraphenyl phosphonium and relationship between proton electrochemical potential and phosphorylation potential in steady state. *The Journal of membrane biology*, 49, 105-21.
- KLIS, F. M., BOORSMA, A. & GROOT, P. W. J. D. 2006. Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 185-202.
- KOTYK, A. 1994. Dependence of the kinetics of secondary active transports in yeast on H⁽⁺⁾-ATPase acidification. *The Journal of membrane biology*, 138, 29-35.
- LAGUNAS, R. 1993. Sugar transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews*, 10, 229-242.
- LESAGE, G. & BUSSEY, H. 2006. Cell Wall Assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Society*, 70, 317-343.
- MACEY, R. I. & MOURA, T. F. 1997. Basic Principles of Transport. In: HOFFMAN, J. F. & JAMESON, J. D. (eds.) *Handbook of Physiology*. Oxford University Press.
- MARAÑÓN, D. & GERVAIS, P. 2001. Involvement of osmotic cell shrinkage on the proton extrusion rate in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell*, 241-246.
- MASSOU, H., ALBIGOT, R. & PRATS, M. 2000. Carboxyfluorescein fluorescence experiments. *Biochemical Education*, 28, 171-173.

- OGATA, E. & RASMUSSEN, H. 1966. Valinomycin and Mitochondrial Ion Transport. *Biochemistry*, 5, 57-66.
- OZCAN, S., DOVER, J. I. M., ROSENWALDT, A. G., WOLFLT, S. & JOHNSTON, M. 1996. Two glucose transporters in *Saccharomyces cerevisiae* are glucose sensors that generate a signal for induction of gene expression. *Genetics*, 93, 12428-12432.
- PRISTA, C., ALMAGRO, A., LOUREIRO-DIAS, M. C. & RAMOS, J. 1997. Physiological basis for the high salt tolerance of *Debaryomyces hansenii*. *Applied and environmental microbiology*, 63, 4005-9.
- RENNER-SATTler, K., FASCHING, M. & GNAIGER, E. 2010. Determination of Membrane Potential with TPP + and an Ion Selective Electrode System. *Mitochondrial Physiology Network*, 14, 1-15.
- REST, M. E. V. A. N. D. E. R., KAMMINGA, A. H., NAKANO, A., ANRAKU, Y., POOLMAN, B. & KONINGS, W. I. L. N. 1995. The Plasma Membrane of *Saccharomyces cerevisiae* : Structure , Function , and Biogenesis. *Microbiology*, 59, 304-322.
- ROSE, M. C. & HENKENS, R. W. 1974. Stability of sodium and potassium complexes of valinomycin. *Biochimica et Biophysica Acta BBA General Subjects*, 372, 426-435.
- ROTTENBERG, H. 1979. The Measurement of Membrane Potential and ΔpH in Cells, Organelles and Vesicles. *Methods in Enzymology*, LV, 547-569.
- SERRANO, R. 1989. Structure and Function of Plasma Membrane ATPase. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 40, 61-94.
- SERRANO, R. 1991. Transport across yeast vacuolar and plasma membranes. *The molecular and cellular biology of the yeast Saccharomyces genome dynamics protein synthesis and energetics*. Cold Spring Harbor.
- SINGER, S. J. & NICOLSON, G. L. 1972. The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes. *Science*, 175, 720.
- SJOBACK, R., NYGREN, J. & KUBISTA, M. 1995. Absorption and fluorescence properties of fluorescein. *Spectrochimica Acta Part A*, 51, L7-L21.
- SOVERAL, G., MADEIRA, A., LOUREIRO-DIAS, M. C. & MOURA, T. F. 2007. Water transport in intact yeast cells as assessed by fluorescence self-quenching. *Applied and environmental microbiology*, 73, 2341-3.
- SOVERAL, G., MADEIRA, A., LOUREIRO-DIAS, M. C. & MOURA, T. F. 2008. Membrane tension regulates water transport in yeast. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1778, 2573-2579.
- SUZUKI, I., UI, M. & YAMAUCHI, A. 2006. Supramolecular Probe for Bicarbonate Exhibiting Anomalous Pyrene Fluorescence in Aqueous Media. 10, 4498-4499.
- VAN UDEN, N. 1967. Transport-Limited Fermentation and Growth of *Saccharomyces cerevisiae* and Its Competitive Inhibition. *Archiv fur Mikrobiologie*, 58, 155-168.
- VILLALOBO, A., BOUTRY, M. & GOFFEAU, A. 1981. Electrogenic proton translocation coupled to ATP hydrolysis by the plasma membrane Mg^{2+} -dependent ATPase of yeast in reconstituted proteoliposomes. *The Journal of Biological Chemistry*, 256, 12081-12087.
- WALSH, M. C., SMITS, H. P., SCHOLTE, M., DAM, K. V. & AL, W. E. T. 1994. Affinity of Glucose Transport in *Saccharomyces cerevisiae* Is Modulated during Growth on Glucose. *Journal of Bacteriology*, 176, 953-958.
- WILLIAMS, N. 1996. Yeast genome sequence ferments new research. *Science*.
- ZIEGENHORN, J., SENN, M. & BUCHER, T. 1976. of Molar Absorptivities of Beta-NADH and BETA-NADHP. *Clinical Chemistry*, 160, 151-160.

VI. ANEXOS

1. Composição de soluções

Tabela 17: Composição das soluções de calibração do sinal de fluorescência in vivo e in vitro, preparadas de acordo com (Breeuwer and Abee, 2000).

Composto	Fórmula Química	Calibração <i>in vivo</i>	Calibração <i>in vitro</i>
		Concentração	Concentração
Glicina	$\text{NH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$	50 mM	50 mM
Ácido Cítrico	$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$	50 mM	50 mM
Hidrato de Sódio Hidrofosfite	NaHPO	50 mM	50 mM
Cloreto de Potássio	KCl	50 mM	50 mM
Ácido acético	$\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$	2% (ou sem adição de ácido)	---
Fluoresceína	$\text{C}_{20}\text{H}_{12}\text{O}_5$	---	10 μM

Tabela 18: Composição das soluções de calibração do sinal de fluorescência in vivo, preparadas de acordo com (Gomori, 1955).

Solução tampão	pH	Soluções utilizadas	Fórmula Química	Concentração inicial	Volume utilizado	Volume total
Citrato-Fosfato	4	Ácido cítrico	$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$	100 mM	30.7 mL	100 mL
		Hidrogenofosfato de sódio	Na_2HPO_4	200 mM	19.3 mL	
	5	Ácido cítrico	$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$	100 mM	24.3 mL	
		Hidrogenofosfato de sódio	Na_2HPO_4	200 mM	25.7 mL	
	6	Ácido cítrico	$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$	100 mM	17.9 mL	
		Hidrogenofosfato de sódio	Na_2HPO_4	200 mM	32.1 mL	
	7	Ácido cítrico	$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$	100 mM	6.5 mL	
		Hidrogenofosfato de sódio	Na_2HPO_4	200 mM	43.5 mL	
Fosfato	8	Fosfato de sódio	NaH_2PO_4	200 mM	5.3 mL	200 mL
		Hidrogenofosfato de sódio	Na_2HPO_4	200 mM	94.7 mL	
Carbonato-Bicarbonato	9.2	Carbonato de Sódio Anidro	Na_2CO_3	200 mM	4 mL	200 mL
		Bicarbonato de Sódio	NaHCO_3	200 mM	46.0 mL	

2. Concentração de glucose extracelular

Na Tabela 19 encontram-se as densidades ópticas (OD) obtidas através do kit de doseamento de glucose extracelular. As correcções às OD foram efectuadas como explicado no ponto II-2, partindo de densidades ópticas do branco de 0.043 (OD₁) e 0.741 (OD₂).

Tabela 19: Dados originais relativos à densidade óptica (OD) observada para a determinação da concentração de glucose extracelular.

Tempo (min)	Factor de diluição	OD ₁	OD ₁ corrigida	OD ₂	OD ₂ corrigida	Δ OD	[glucose] (g.L ⁻¹)	[glucose] corrigida (g.L ⁻¹)	[glucose] (M)
0	1:10	0.716	-0.031	0.976	0.229	0.26	0.225	2.245	1.25E-02
2		0.74	-0.007	1.016	0.269	0.276	0.238	2.384	1.32E-02
4		0.709	-0.038	0.934	0.187	0.225	0.194	1.943	1.08E-02
6		0.711	-0.036	0.901	0.154	0.19	0.164	1.641	9.11E-03
8		0.606	-0.141	0.793	0.046	0.187	0.161	1.615	8.96E-03
10		0.601	-0.146	0.763	0.016	0.162	0.140	1.399	7.77E-03
12		0.655	-0.092	0.788	0.041	0.133	0.115	1.149	6.38E-03
14	Sem dil.	0.743	-0.004	1.863	1.116	1.12	0.967	0.967	5.37E-03
16		0.612	-0.135	1.496	0.749	0.884	0.763	0.763	4.24E-03
18		0.718	-0.029	1.479	0.732	0.761	0.657	0.657	3.65E-03
20		0.715	-0.032	1.548	0.801	0.833	0.719	0.719	3.99E-03
22		0.714	-0.033	1.268	0.521	0.554	0.478	0.478	2.66E-03
24		0.711	-0.036	1.235	0.488	0.524	0.453	0.453	2.51E-03
26		0.71	-0.037	1.106	0.359	0.396	0.342	0.342	1.90E-03
28		0.702	-0.045	1.005	0.258	0.303	0.262	0.262	1.45E-03
30		0.713	-0.034	0.917	0.17	0.204	0.176	0.176	9.78E-04

3. Ensaio de variação de pH extracelular

A curva de pH extracelular utilizada na secção III corresponde a uma média dos ensaios apresentados na Figura 38.

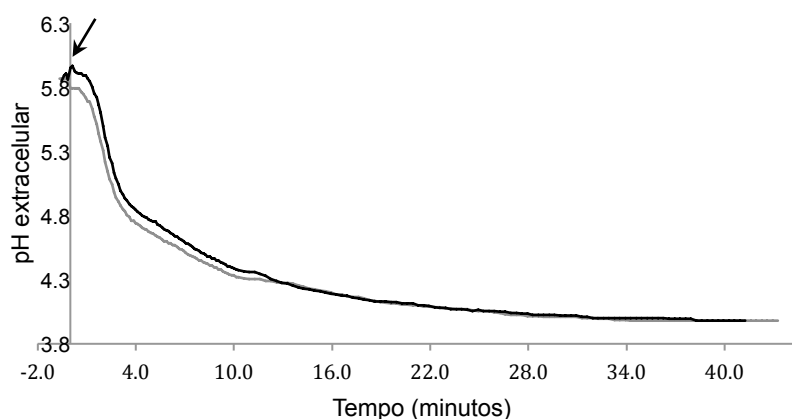


Figura 38: Dados experimentais relativos a dois ensaios de pH extracelular após adição de um pulso de glucose. A seta indica o momento de adição da glucose.

A titulação da membrana foi realizada adicionando volumes conhecidos de soluções de HCl e medindo o pH correspondente. Estes valores encontram-se apresentados na Tabela 20.

Tabela 20: Valores de pH medidos após adição de volumes determinados de HCl.

pH medido	volume adicionado (uL)	[HCl] solução adicionada (M)
6.52	5	0.1
6.29	5	0.1
6.05	5	0.1
5.71	5	0.1
5	5	0.1
4.81	10	0.01
4.59	10	0.01
4.41	10	0.01
4.3	10	0.01
4.16	10	0.01
4.05	10	0.01
3.95	10	0.01

4. Ensaios de pH intracelular após adição de um pulso de glucose

4.1. Microscopia de fluorescência

Para a calibração do sinal de pH intracelular determinado por microscopia de fluorescência foram utilizadas as soluções com a composição descrita no ponto VI-1. Foram medidas as osmolaridades destas soluções e encontram-se apresentadas na Tabela 21.

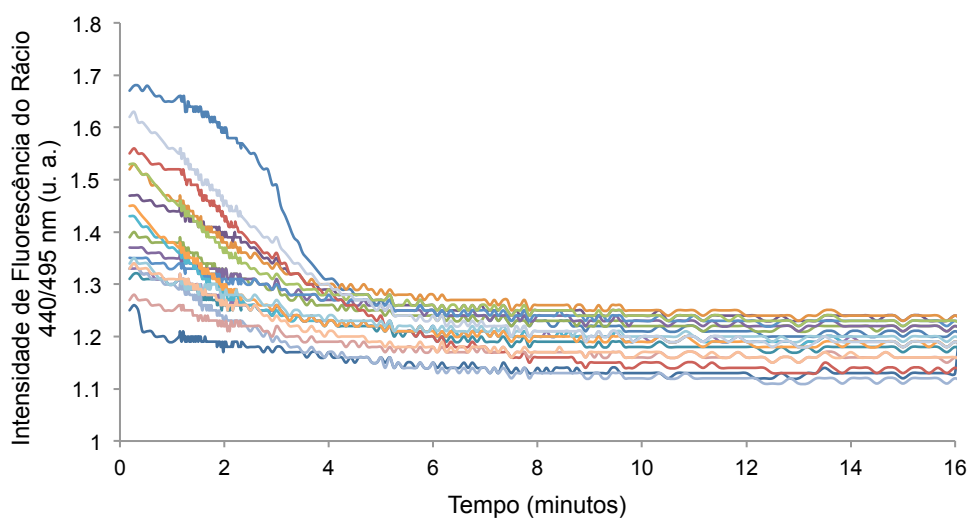


Figura 39: Sinal correspondente ao rácio 440 nm/495 nm, observado para todas as células fluorescentes no campo de visão (Figura 23-B), correspondente à calibração *in vivo*, obtida com 100 ms de exposição, ganho 2x

Para análise dos dados foi utilizada uma média de todos os sinais obtidos, para as diferentes células ou regiões no campo de visão. Na Figura 39 encontram-se representados todos os sinais obtidos para o ensaio com adição de glucose e na Figura 40 os sinais correspondentes às duas calibrações, *in vivo* e *in vitro*.

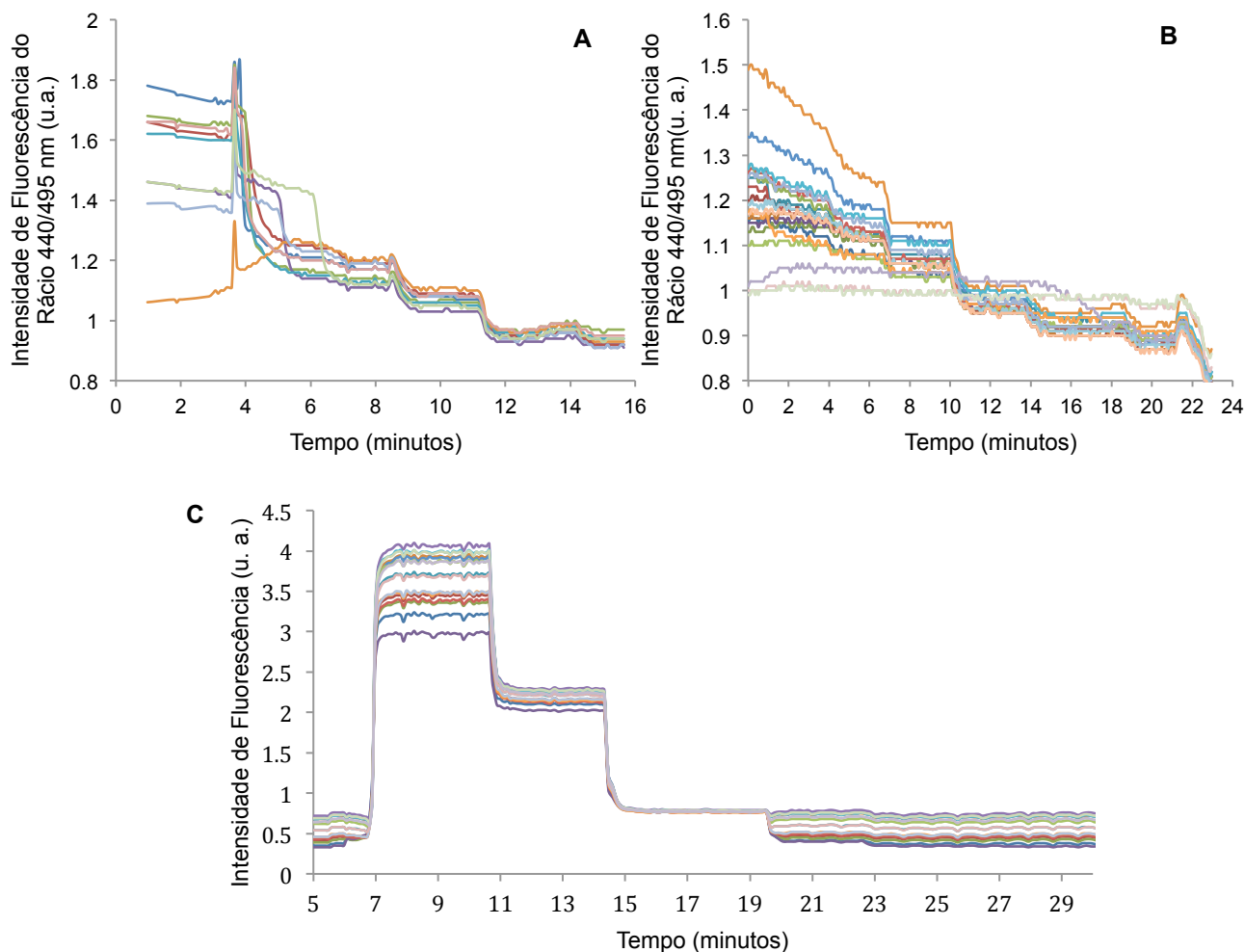


Figura 40: A - Sinal correspondente ao rácio 440 nm/495 nm, observado para todas as células fluorescentes no campo de visão (Figura 24-B), correspondente à calibração *in vivo* com perfusão de soluções sem ácido acético preparadas de acordo com (Breeuwer and Abee 2000), obtida com 100 ms de exposição, ganho 2x; B - Sinal correspondente ao rácio 440 nm/495 nm, observado para todas as células fluorescentes no campo de visão (Figura 25-B), correspondente à calibração *in vivo* com perfusão de soluções tampão preparadas de acordo com (Gomori, 1955), obtida com 100 ms de exposição, ganho 2x;; B - Sinal correspondente ao rácio 440 nm/495 nm (, medido correspondente à calibração *in vitro*, obtida com 100 ms de exposição, ganho 1x.

Tabela 21: Osmolaridades medidas para as soluções utilizadas na determinação do pH intracelular por fluorescência.

Solução	pH	Medição 1 (mosm)	Medição 2 (mosm)	Medição 3 (mosm)
Soluções tampão de acordo com (Breeuwer and Abee, 2000) sem ácido acético	4	392.5	397.5	397.5
	5	392.5	392.5	390
	6	360	357.5	360
	7	397.5	397.5	397.5
	8	360	365	360
	9	440	440	440
Soluções tampão de acordo com (Breeuwer and Abee, 2000) com ácido acético	5	980	970	990
	6	1080	1090	1090
	7	1190	1190	1190
	8	1150	1180	1180
Soluções tampão de acordo com (Gomori, 1955)	4.03	127.5	130	127.5
	5	150	150	152.5
	6.01	172.5	170	170
	7.06	205	202.5	205
	8.02	222.5	222.5	220
	9.06	192.5	190	192.5
Solução de glucose 11 mM em solução tampão a pH 5	---	15	15	15

4.2. Marcação com isótopos radioactivos

Para determinação da variação do pH intracelular, quer temporal quer em função do pH extracelular, foram utilizados valores médios dos dados apresentados na Figura 41.

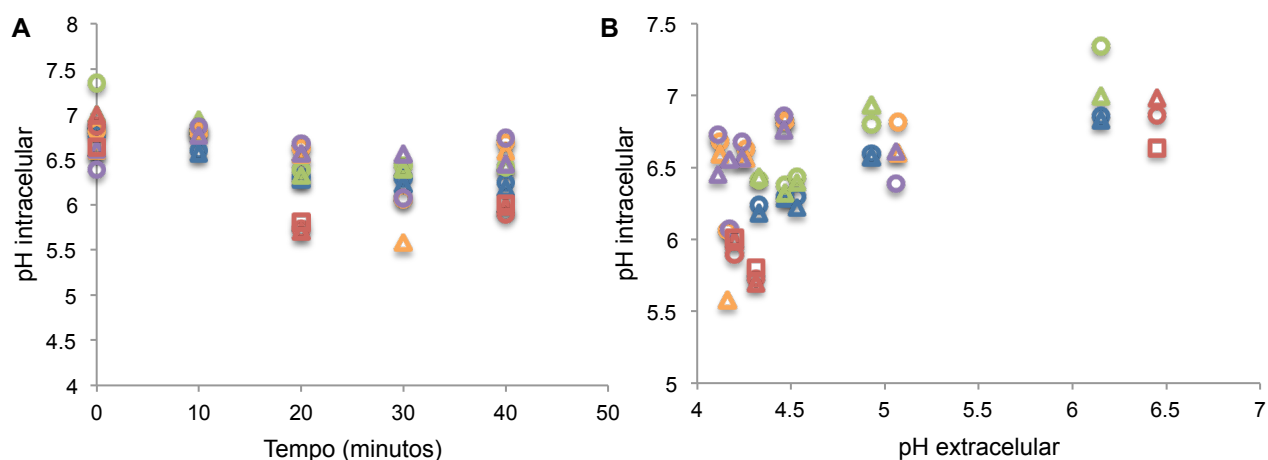


Figura 41: Dados experimentais de pH intracelular em função do tempo (A) e em função do pH extracelular (B), ambos após um pulso de glucose, dado ao tempo zero.

5. Ensaios de variação de concentração de K^+ extracelular após adição de um pulso de glucose

Os dados experimentais de variação temporal de concentração extracelular de K^+ , após adição de um pulso de glucose, apresentados no ponto III-6 correspondem à média de dois ensaios, apresentados na Figura 42. Na

Tabela 22 encontram-se apresentados os dados relativos à calibração, em que se pode ver a correspondência entre a quantidade de K^+ extracelular e a distância no papel, relativa ao deslocamento da caneta do registador.

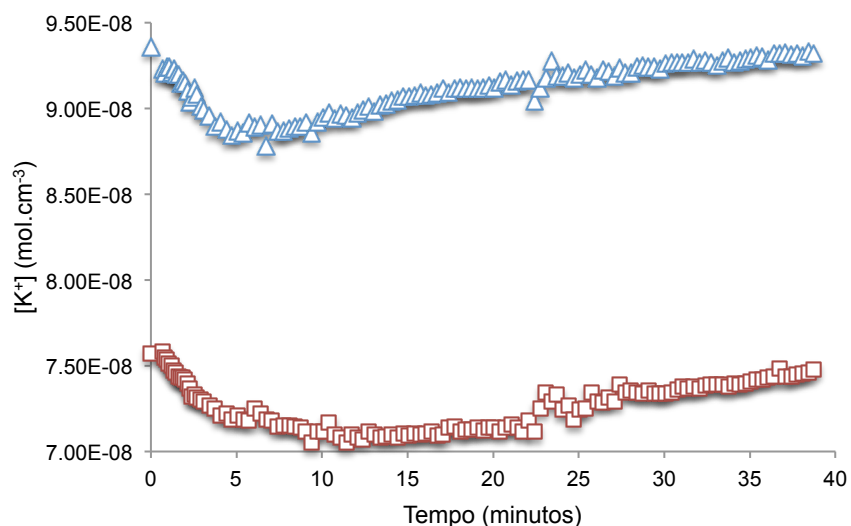


Figura 42: Ensaios individuais de variação da concentração extracelular de K^+ extracelular.

Tabela 22: Volumes adicionados de KCl à suspensão celular, e respectiva quantidade total de KCl no meio. Dados utilizados para a calibração dos dados experimentais.

Distância total (cm)	Volume adicionado (uL)	[KCl] _{adicionado} (M)	Quantidade KCl (mol)	Quantidade KCl total (mol)
0				
0.6	30	0.001	3.00×10^{-8}	3.00×10^{-8}
1.8	40	0.001	4.00×10^{-8}	7.00×10^{-8}
3.8	30	0.01	3.00×10^{-7}	3.70×10^{-7}
5.45	30	0.01	3.00×10^{-7}	6.70×10^{-7}
11.85	30	0.1	3.00×10^{-6}	3.67×10^{-6}

6. Permeabilidade da membrana ao próton

Na Figura 43 encontram-se apresentados os três ensaios individuais de variação temporal de pH extracelular, utilizados para a determinação da permeabilidade da membrana.

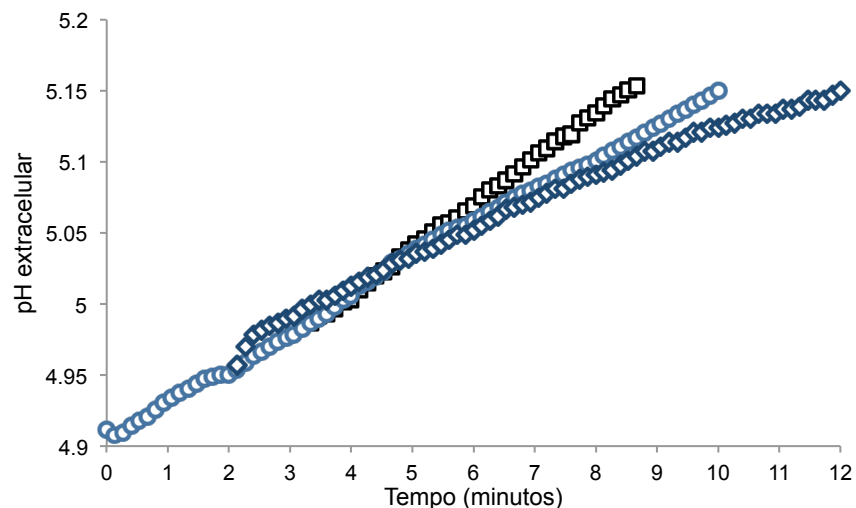


Figura 43: Ensaios individuais relativos à variação de pH extracelular por influxo de prótons (permeabilidade da membrana).

7. Modelo Global

O modelo de simulação numérica e modelação matemática foi desenvolvido no *software* Berkeley Madonna e encontra-se apresentado abaixo.

METHOD RK4

STARTTIME = 0

STOPTIME = 10

DT = 0.02

R=8.314 {J.mol⁻¹.K⁻¹}

F=96500 {C.mol⁻¹}

TempC=25 {C}

T=273+TempC {K}

zH=1

zK=1

raio =1.73e-4 {cm}

Peso_seco=0.225 {mg.mL⁻¹, peso seco da suspensão celular}

Vin_cell=2.2e-3 {cm³.mg⁻¹, 2.2 microlitros mg⁻¹, volume interno por peso seco}

Vtotal_ensaio=5 {cm³, volume externo total do ensaio}

$V_{susp}=0.5$ {cm³, volume de suspensão celular adicionada}
 $area_cell=4*3.14*(raio^2)$ {cm², área da esfera}
 $V_cell=(4/3)*3.14*(raio^3)$ {cm³, volume da esfera}
 $Area= N_cell* area_cell$ {cm²}
 $N_cell= Vin/V_cell$ {número de células, utilizando o V_t e o volume determinado para cada célula}
 $V_{out}= V_{total_ensaio} - Vin$ {cm³, volume externo do ensaio}
 $Vin=Vin_cell*(Peso_Seco*Vsusp)$ {cm³, volume interno total para a população de células do ensaio}
 $pK_{memb1}=6.9175$
 $pK_{memb2}=4.7871$
 $K_{memb_1_M}=10^{(-pK_{memb1})}$ {M}
 $K_{memb_1}=K_{memb_1_M}/1000$ {moles.cm⁻³}
 $K_{memb_2_M}=10^{(-pK_{memb2})}$ {M}
 $K_{memb_2}=K_{memb_2_M}/1000$ {moles.cm⁻³}
 $MH0_PS= 5.5612e-7$ {mol.cm⁻³.mg⁻¹}
 $MH0 = MH0_PS*(Peso_seco*Vsusp)$ {moles.cm⁻³}
 $Mt=Mt_init*Peso_seco*Vsusp$ {mol.cm⁻³}
 $Mt_init= 5.13054e-6$ {ver unidades, retirado da calibração da membrana}
 $Perm_H=1e-4$ {cm.s⁻¹} {valor retirado do modelo da permeabilidade}
 $gK=0.75$ {condutância do potássio}
 $gH=1-gK$ {condutância do prótão}
 $Electrogene_mV=-10$ {electrogeneicidade sistemas transporte}
 $Electrogene_V= Electrogene_mV*1e-3$
 $EH=-(R*T/(zH*F))*\ln(Hin_M/Hfree_T_M)$
 $EK=-3.1035e-18*time^5+2.1821e-14*time^4-5.9062e-11*time^3+7.6383e-8*time^2-4.2747e-5*time-1.9381e-1$
 $V= gH*EH+gk*EK +Electrogene_V$ {V}
 $pH_{out_init} = 5.87179966$ {pH inicial do ensaio}
 $pH_{in_init}=-0.115216*pH_{out_init}^2+1.56229*pH_{out_init}+1.93326$ {pH intracelular inicial do ensaio retirado do pH out inicial através do ajuste com o polinómio}
 $Hin_init_M= 10^{-pH_{in_init}}$ {M}
 $Hin_init=Hin_init_M/1000$ {mol.cm⁻³}
 $H_{total_init}=H_{total_init_pol}$ {mol.cm⁻³}
 $H_{total_init_pol}=-5.81305e-8*pH_{out_init}^3+8.37415e-7*pH_{out_init}^2-4.12771e-6*pH_{out_init}+7.13559e-6$ {mol.cm⁻³, concentração total de prótões extracelulares inicial através da calibração com o polinómio - - ANDREIA 2011}
 $pH_{out}=-\log_{10}(Hfree_T_M)$
 $Hfree_T_M= Hfree_T*1000$ {M, sendo o $Hfree_T$ calculado pelo root solver}

$pH_{in} = -0.115216 \cdot pH_{out}^2 + 1.56229 \cdot pH_{out} + 1.93326$ {pH intracelular retirado do pH out através do ajuste com o polinômio}

$Hin_M = 10^{-pH_{in}}$ {M}

$Hin = Hin_M / 1000$ {mol.cm-3}

$Vm_Gluo_PS = 2.86e-8$ {mol.cm-3.s-1.mg-1, valor por peso seco}

$Vm_Gluo = Vm_gluo_PS \cdot (Peso_seco \cdot Vsusp)$ {mol.cm-3.s-1, valor normalizado para o peso seco do ensaio de pH}

$Km_Gluo = 1e-5$ {mol.cm-3}

$Gluo_init = 1.34402e-5$ {mol.cm-3}

$Gluin_init = 0$ {mol.cm-3}

$G6p_init = 0$ {mol.cm-3}

$ATP_init = 0$

$k_fosf = 1$ {s-1, valor elevado, passagem de Glu_in para Glu-6-P é muito rápido}

$k_glic = 0.00356791$ {s-1}

$Vmax_ATP_Hin_max = 7.09263e-4$ {mol.cm-3.s-1}

$Km_ATP = 3.85728e-4$ {mol.cm-3}

$Km_Hin = 1.85076e-6$ {mol.cm-3}

$Init\ QGlu_o = Gluo_init \cdot Vout$ {moles}

$Init\ QGlu_i = Gluin_init \cdot Vin$ {moles}

$Init\ QG6p = G6p_init \cdot Vin$ {moles}

$Init\ QATP = ATP_init \cdot Vin$ {moles}

$Init\ QHtotal_novo = Htotal_init \cdot Vout$ {moles}

$d/dt(QGlu_o) = -Entrada_Glu_o$ {moles}

$d/dt(QGlu_i) = Entrada_Glu_o - consumo_Glu_i$ {moles}

$d/dt(QG6p) = consumo_Glu_i - consumo_G6p$ {moles}

$d/dt(QATP) = 2 \cdot Consumo_G6p - Bomba$ {moles}

$d/dt(QHtotal_novo) = Bomba + Fluxo_entrada$

$Init\ QHtotal_bomba = 0$ {FUNCIONAMENTO SÓ DA BOMBA}

$Init\ QATP_T = 0$

$d/dt(QHtotal_bomba) = Bomba$ {Funcionamento BOMBA}

$d/dt(QATP_T) = 2 \cdot Consumo_G6p$ {Produção TOTAL de ATP}

$ATP_T = QATP_T / Vin$

$Htotal_bomba = QHtotal_bomba / Vin$

$Entrada_Glu_o = Vm_Gluo \cdot Gluo / (Km_Gluo + Gluo) \cdot Vout$ {moles}

$Consumo_Glu_i = k_fosf \cdot Gluin \cdot Vin$ {moles}

$Consumo_G6p = k_glic \cdot G6p \cdot vin$ {moles}

$Fluxo_entrada = Factor_permH \cdot Perm_H \cdot ((ZH \cdot F \cdot V) / (R \cdot T)) / (\exp((ZH \cdot F \cdot V) / (R \cdot T)) - 1) \cdot (Hin \cdot \exp((ZH \cdot F \cdot V) / (R \cdot T)) - Hfree_T) \cdot Area$ {moles}

```

Bomba=Factor_bomba*Vmax_ATP_Hin*((ATP)/((Km_ATP)+(ATP)))*(Hin/(Km_Hin+Hin))*Vin
{moles}
Factor_bomba=1 {Parâmetro para acelerar todo o processo de re-circulação do próton}
Factor_permH=1
BALANÇO_ATP=2*Consumo_G6p-Bomba
Gluo=Qglu_o/Vout      {mol.cm-3}
Gluin=Qglu_i/vin      {mol.cm-3}
G6p=QG6p/Vin      {mol.cm-3}
ATP=QATP/vin      {mol.cm-3}
Htotal_novo=QHtotal_novo/Vout
Gluo_mM=Gluo*1E6      {mM}
Gluin_mM=Gluin*1E6      {mM}
G6p_mM=G6p*1E6
ATP_mM=ATP*1E6
Gluo_M=Gluo*1000      {M}
Gluin_M=Gluin*1000      {M}
G6p_M=G6p*1000
ATP_M=ATP*1000
Hdif=Htotal-(Hbound_T-MH0)-Hfree_T-(CO2_meio-Grupo_H)      {mol.cm-3, Esta diferença deve ser
igual a 0}
Hbound_T=(Mt*(2*(Hfree_T/Kmemb_2)+1))/(1+(Hfree_T/Kmemb_2)+(Kmemb_1/Hfree_T)))
{mol.cm-3}
Hbound=Hbound_T-MH0 {só à membrana}
GRUPO_H=Grupo*Hfree_T/Kgrupo
Kgrupo_M=10^-pKgrupo
Kgrupo= Kgrupo_M/1000
pKgrupo=1
Grupo=GRupo_T/(1+Hfree_T/Kgrupo)
Grupo_T=0
GRUPO_TOTAL = Grupo+ GRUPO_H
{Root finder}
guess Hfree_T =1e-10
roots Hfree_T=Htotal_novo-Hfree_T-Hbound-Grupo_H-co2_meio
Hbound_novo= Hbound+Grupo_H
limit Hfree_T >=8e-11      {moles/cm3}
limit Hfree_T <=3e-7      {moles/cm3}
Vmax_ATP_Hin =IF (time <= time1) THEN Vmax_ATP_Hin_max ELSE Vmax_ATP_Hin_X
Vmax_ATP_Hin_X =IF (time >= time2) THEN Vmax_ATP_Hin_med ELSE Vmax_ATP_Hin_min

```

```
Factor_polariza_min =1
factor_polariza= 1- (STEP(Val1,(START1+ DURATION1))*(1-EXP(-RISE1*AL1)))
+(STEP(Val2,START2)*(1-EXP(-RISE2*AL2)))
START1 = 200
START2 =655
val1=0.6
val2=0.3
DURATION1 = 10
DURATION2 = 20
Rise1=0.025
Rise2=0.025
AL1=STEP(1,START1)*(TIME-START1)
AL2=STEP(1,START2)*(TIME-START2)
Vmax_ATP_Hin= Vmax_ATP_Hin_max* factor_polariza
```